

**Sveučilište u Zagrebu**  
**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**  
**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Izvorka Laljak**  
**6783/BT**

**UZGOJ MIKROORGANIZAMA NA ČVRSTIM**  
**SUPSTRATIMA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Modul: Biotehnologija 2**

**Mentor: izv.prof. dr.sc. *Vlatka Petravić Tominac***

**Zagreb, 2015.**

*Zahvaljujem mentorici izv. prof. dr.sc. Vlatki Petravić Tominac na pomoći i trudu pri izradi ovog rada.*

## DOKUMENTACIJSKA KARTICA

**Završni rad**

**Sveučilište u Zagrebu**

**Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

**Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Zavod za biokemijsko inženjerstvo**

**Laboratorij za biokemijsko inženjerstvo, industrijsku mikrobiologiju i tehnologiju slada i piva**

### UZGOJ MIKROORGANIZAMA NA ČVRSTIM SUPSTRATIMA

*Izvorka Laljak 6783/BT*

**Sažetak:** Bioprocesi se mogu podijeliti u dvije velike skupine: submerzni uzgoj (SLF) i uzgoj na čvrstim supstratima (eng. solid state fermentation, SSF). Za razliku od submerznog uzgoja, kod SSF nema slobodno tekuće vode. Tradicionalni oblici SSF-procesa prakticiraju se još od davnina za dobivanje fermentirane hrane i pića. Primjena SSF poprilično je ograničena, a razvoj suvremene biotehnologije do sada je bio usmjeren uglavnom na submerzne procese koji su se pokazali pogodnijima za većinu proizvoda. Međutim, u određenim okolnostima i za određene proizvode, SSF je svakako prikladna, a ponekad i bolja opcija. U ovom završnom radu dan je teorijski pregled uzgoja na čvrstim supstratima, pojašnjeni su fizikalni čimbenici (vlaga, temperatura, pH-vrijednost, sastav plinovite faze, koncentracije supstrata i produkata) koji utječu na rast mikroorganizama u SSF-procesu. Prikazani su tipovi SSF-bioreaktora i navedene su mogućnosti mjerenja i kontrole procesnih parametara. Dan je i kratak pregled matematičkih modela SSF i izolacije proizvoda.

**Ključne riječi:** uzgoj na čvrstim supstratima, lignocelulozne sirovine

**Rad sadrži:** 62 stranice, 20 slika, 3 tablice, 33 literaturna navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

**Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku (pdf format) pohranjen u:** Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** izv. prof. dr.sc. Vlatka Petravić Tominac

**Rad predan:** rujan 2015.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Final work**

**University of Zagreb**

**Faculty of Food Technology and Biotechnology**

**Undergraduate study Biotechnology**

**Department of Biochemical Engineering**

**Laboratory for Biochemical Engineering, Industrial Microbiology and Brewing**

## **SOLID-STATE FERMENTATION**

***Izvorka Laljak 6783/BT***

**Abstract:** Bioprocesses can be divided into two major groups: submerged fermentation (SLF) and solid state fermentation (SSF). Unlike submerged culture, in SSF there is no free liquid water. Traditional forms of SSF process have been used from ancient times to obtain fermented foods and beverages. The application of SSF is quite limited and the development of modern biotechnology has so far focused mainly on submerged processes that have proven to be more appropriate for most products. However, in certain circumstances and for certain products, SSF is certainly appropriate, and sometimes a better option. This final work gave a theoretical overview of cultivation on solid substrates, clarified the physical factors (humidity, temperature, pH, gas phase composition, substrate and product concentrations) that affect the growth of microorganisms in SSF. Types of SSF bioreactors were shown, as well as options of measurement and control. A brief overview of mathematical modelling and product recovery is also given.

**Keywords:** solid-state fermentation (SSF), lignocellulosic feedstock

**Thesis contains:** 62 pages, 20 figures, 3 tables, 33 references

**Original in:** Croatian

**Final work in printed and electronic (pdf format) version deposited in:** Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

**Mentor:** *PhD. Vlatka Petravić Tominac, Associate Professor*

**Thesis delivered:** September 2015.

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>2</b>
2.1. Definicija i značajke uzgoja na čvrstim supstratima .....	2
2.1.1. Povijest SSF-procesa .....	3
2.1.2. Usporedba SSF i submerznog uzgoja .....	4
2.2. Supstrati i sirovine za SSF .....	6
2.2.1. Škrobne sirovine.....	6
2.2.2. Lignocelulozne sirovine.....	7
2.2.2.1. Celuloza .....	8
2.2.2.2. Hemiceluloza .....	9
2.2.2.3. Lignin .....	10
2.2.3. Sirovine koje sadrže uglavnom topljive šećere.....	12
2.3. Svojstva čestica sirovine u SSF-bioreктору .....	13
2.4. Tipovi kultura i mikroorganizmi za uzgoj na čvrstim supstratima .....	16
2.4.1. Tipovi kultura u SSF.....	16
2.4.2. Mikroorganizmi koji se koriste u SSF-procesima .....	17
2.4.2.1. Kvasci u SSF-procesima .....	17
2.4.2.2. Bakterije u SSF-procesima .....	17
2.4.2.3. Filamentozni fungi u SSF-procesima .....	18
2.4.3. Način rasta mikroorganizama u SSF-procesima .....	20
2.4.3.1. Način rasta kvasaca i bakterija u SSF-procesima .....	20
2.4.3.2. Način rasta filamentoznih funga u SSF-procesima .....	21
2.5. Fizikalni čimbenici koji utječu na rast mikroorganizama u SSF.....	22
2.5.1. Dostupnost vlage.....	22
2.5.2. pH-vrijednost.....	23
2.5.3. Temperatura.....	23
2.5.4. Sastav plinova u okolini supstrata.....	24
2.5.5. Koncentracije supstrata i produkata .....	24
2.6. Mjerenje i kontrola u SSF.....	26
2.6.1. Procjena udjela biomase.....	26

2.6.1.1. Procjena biomase mjerenjem metaboličke aktivnosti.....	27
2.6.1.2. Procjena biomase mjerenjem udjela određenih komponenata biomase.....	27
2.6.2. Mjerenje i kontrola procesnih parametara.....	29
2.6.2.1. Mjerenje i kontrola prisutne vlage.....	29
2.6.2.2. Mjerenje i kontrola pH-vrijednosti.....	30
2.6.2.3. Mjerenje i kontrola temperature.....	30
2.6.2.4. Kontrola sastava plinova.....	31
2.6.2.5. Praćenje koncentracija supstrata i produkata.....	31
2.7. Bioreaktori za uzgoj na čvrstim supstratima.....	32
2.7.1. Tipovi bioreaktora za uzgoj na čvrstim supstratima.....	34
2.7.1.1. Bioreaktori s tavama (eng. tray bioreactors).....	36
2.7.1.2. Statični bioreaktori s fiksnim slojem i bioreaktori s fiksnim slojem i povremenim miješanjem.....	38
2.7.1.3. Bioreaktori s rotirajućim bubnjem i bioreaktori s bubnjem i miješanjem.....	41
2.7.1.4. Bioreaktori s miješanim slojem, vibrirajućim bubnjem i fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem .....	44
2.8. Modeliranje SSF-bioreaktora.....	48
2.8.1. Modeliranje kinetike rasta.....	48
2.8.2. Modeliranje prijenosa mase i topline u sloju supstrata.....	51
2.9. Izdvajanje proizvoda SSF-procesa.....	54
2.9.1. Ekstrakcija enzima.....	54
2.9.2. Ispiranje drugih proizvoda.....	56
2.9.3. Izdvajanje hlapljivih proizvoda.....	57

2.9.4. Izdvajanje fungalnih spora.....	57
<b>3. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>58</b>
<b>4. LITERATURA.....</b>	<b>59</b>

## **1.UVOD**



Bioprocesi se mogu podijeliti u dvije velike skupine: uzgoj na čvrstim supstratima (eng. solid state fermentation, SSF) i submerzni uzgoj (eng. submerged liquid fermentation, SLF). (Mitchell i sur., 2002) Kod uzgoja na čvrstim supstratima (SSF) nema slobodno tekuće vode, za razliku od submerznog uzgoja (SLF).

Tradicionalni oblici SSF-procesa prakticiraju se još od davnina za dobivanje fermentirane hrane i pića. Međutim primjena SSF u sklopu moderne biotehnologije poprilično je ograničena, a tijekom 20. stoljeća SSF je relativno zapostavljen. Razvoj suvremene biotehnologije do sada je bio usmjeren uglavnom na tehnologije u kojima je bio zastupljen submerzni uzgoj, koji se pokazao pogodnijim za većinu proizvoda (Mitchell i sur., 2002).

Međutim, u određenim okolnostima, i za određene proizvode, SSF je svakako prikladna, a ponekad i bolja opcija. Na primjer, pri proizvodnji fungalnih enzima ili spora je veći prinos ili su bolja svojstva proizvoda ukoliko se koriste SSF-sustavi. Nadalje, kada je prioritet zbrinjavanje čvrstog organskog otpada iz poljoprivrede ili prehrambene industrije, onda upravo SSF omogućuje njegovo korištenje bez zahtjevnih postupaka predobrade. (Mitchell i sur., 2006).

Većinu poljoprivredno-industrijskog biljnog otpada, koji konstantno nastaje po cijelome svijetu, čine lignocelulozne sirovine. Umjesto da se ove obnovljive sirovine spaljuju, mogu se koristiti kao jeftina biotehnološka sirovina za različite SSF-procese. (Mussatto i sur., 2009). S obzirom na globalno prepoznatu važnost i potencijal SSF-tehnologije, tijekom zadnjih desetljeća zabilježen je nagli porast broja provedenih istraživanja i objavljenih radova iz tog područja. (Pandey i sur., 2000; Thomas i sur, 2013).

Stoga su ciljevi ovog završnog rada:

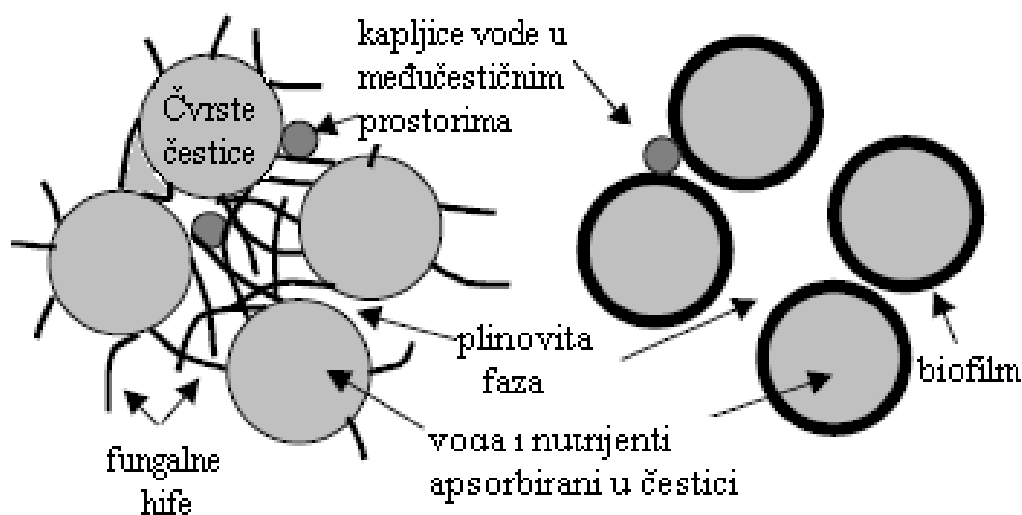
- dati teorijski pregled uzgoja na čvrstim supstratima;
- prikazati tipove bioreaktora koji se pritom mogu koristiti;
- navesti primjere proizvoda koji se mogu dobiti ovakvim postupcima.

## **2. TEORIJSKI DIO**

## 2.1. Definicija i značajke uzgoja na čvrstim supstratima

Uzgoj na čvrstim supstratima (eng. solid state fermentation, SSF) podrazumijeva uzgoj mikroorganizama na materijalu koji gotovo ne sadrži, ili uopće ne sadrži, slobodnu vodu. U takvim sustavima, voda se nalazi u obliku vlage unutar čestica čvrstog materijala, a može biti i u obliku tankog filma na površini čvrstih čestica ili u obliku kapljica između čvrstih čestica. U svakom slučaju, u prostoru između čestica vodena faza je diskontinuirana, a prisutna je kontinuirana plinovita faza (Slika 1). Čvrsti materijal je najčešće izvor ugljika i drugih nutrijenata, ali može se provesti i dodatno prihranjivanje. U nekim slučajevima, čvrsti materijal je čak potpuno inertan i služi samo kao nosač, u kojemu je apsorbirana hranjiva otopina (Mitchell i sur., 2006; Thomas i sur., 2013).

Kad bi brojčano izrazili odnose između čvrste i tekuće tvari u SSF-sustavima, mogli bi reći da se maseni udio čvrste tvari kreće između 20 i 70 %. Za razliku od submerznog uzgoja (eng. submerged liquid fermentation, SLF), gdje količina čvrste tvari rijetko prelazi 50 g/L (što je manje od 5 % masenog udjela) (Mitchell i sur., 2002).



**Slika 1.** Značajke uzgoja na čvrstim supstratima: raspored vlažnih čvrstih čestica i plinovite faze u SSF-sustavima kod uzgoja filamentoznih organizama (lijevo), odnosno jednostaničnih organizama (desno) (Mitchell i sur., 2006).

### 2.1.1. Povijest SSF-procesa

Tradicionalni oblici SSF-procesa, korišteni za dobivanje fermentirane hrane i pića, spadaju u najstarija znanja dostupna čovjeku i sežu još u prapovijest (Singh i sur, 2008). Ovom drevnom postupku je tijekom posljednja dva desetljeća posvećeno više pozornosti, s obzirom na njegovu sposobnost i uspjeh kod više vrsta fermentacijskih procesa, uključujući upravljanje čvrstim otpadom, očuvanje energije biomase i proizvodnju sekundarnih metabolita (Ali i Zulkali, 2011). Tablica 1 daje kratak pregled povijesnog razvoja SSF-procesa.

**Tablica 1.** Povijest i razvitak uzgoja na čvrstom supstratu (SSF). (Ali i Zulkali, 2011).

Period	Razvojni proces
2600. pr.Kr.	Egipćani proizvode kruh
2500. pr.Kr.	Fermentacija/konzerviranje ribe pomoću šećera, škroba, soli itd.; <i>koji</i> proces
1000. pr.Kr.	Proizvodnja sira pomoću <i>Penicillium roqueforti</i> u Aziji
7.st.	Budistički svećenici prenose <i>koji</i> proces iz Kine u Japan; proizvodnja octa iz komine
18.st.	Galna kiselina, koristi se u štavljenju kože, tiskarstvu itd.
1860.-1900.g.	Obrada kanalizacije i otpadnih voda
1900.-1920.g.	Fungalni enzimi (uglavnom amilaze); kojična kiselina (eng. kojic acid)
1920.-1940.g.	Fungalni enzimi, glukonska kiselina; fermentor s rotirajućim bubnjem; limunska kiselina
1940.-1950.g.	Izuzetan razvitak u fermentacijskoj industriji. Proizvodnja penicilina pomoću SSF i submerznog uzgoja.
1950.-1960.g.	Transformacija steroida pomoću kultura funga
1960.-1980.g.	Proizvodnja mikotoksina; krmiva obogaćena proteinima
1980.-danas	Razni drugi proizvodi poput alkohola, giberelinske kiseline itd.

Različiti proizvodi dobivali su se SSF-procesima u drevnom Egiptu i Kini (Chen i Zhu, 2013; Anonymus 1, 2015; Anonymus 2, 2015). Neki od njih su kinesko vino, fermentirano tijesto, ocat, sojin umak, sufu (fermentirani tofu) i fermentirana zrna soje (tzv. natto).

Japanski *koji* proces je nastao na temelju kineskog procesa, prenesenog preko budista, a obuhvaća razne oblike fermentacije hrane, obično uključujući plijesan *Aspergillus oryzae*. Neki poznati primjeri azijske hrane i pića proizvedene takvim procesom su japanski *miso* (fermentirana pasta od soje), sake (alkoholni napitak dobiven od riže) i indonezijski *tempeh* (fermentirana zrna soje u čvrstom obliku kolača) (Chen i Zhu, 2013; Mitchell i sur., 2002; Anonymus 3, 2015).

Zapadnjački primjeri tradicionalnih procesa su tzv. plavi sir (sir unutar kojeg je porasla plemenita plijesan) i sirevi Camembert i Brie, na kojima plijesan raste po vanjskoj površini. Klasično siliranje je također anaerobni SSF-proces kojim se poljoprivredni biljni materijal (kukuruzovina, trava, mahunarke i sl.) koji sadrži 25 - 40% suhe tvari gusto pakira u silose, radi istiskivanja zraka iz materijala i postizanja temperature 25 - 30°C tijekom procesa (Mitchell i sur., 2002).

Kompostiranje tehnički pripada SSF-procesima, međutim zbog razlika u nekim parametrima procesa, obično se tretira kao zaseban proces. Za razliku od tipičnog SSF-procesa, kod kompostiranja su poželjni veći porasti temperature, što pomaže u sprečavanju rasta patogena. Također, tako je potaknuta sukcesija različitih mikrobnih populacija, koje razgrađuju različite organske komponente kompostiranog materijala (Mitchell i sur., 2002).

Nakon tradicionalnih procesa, razvoj SSF-tehnologije se sve više usmjeravao na neprehrambene proizvode. U 40-tim godinama 20. stoljeća proizvedeni su prvi enzimi i organske kiseline, a uslijed svjetskog rata i povećane potražnje antibiotika, potaknuto je i njihovo dobivanje SSF putem (Chen i Zhu, 2013).

Od kasnih 70-tih godina 20. stoljeća pojačavao se interes za SSF i provođena su istraživanja o potencijalima ovako dobivenih proizvoda. Danas se modernim SSF-postupcima dobiva širok spektar biotehnoloških proizvoda, kao što su enzimi, organske kiseline, antibiotici, vitamini, hrana i krmiva, male organske molekule, arome, pigmenti, biopolimeri, biopesticidi, a provode se industrijski bioprocesi poput bioremedijacije i biopulpinga (Mitchell i sur., 2002; Pandey i sur., 2000).

### **2.1.2. Usporedba uzgoja na čvrstim supstratima (SSF) i submerznog uzgoja (SLF)**

Uzgoj na čvrstim supstratima po mnogim se karakteristikama razlikuje od submerznog uzgoja. Usporedba tih karakteristika prikazana je u Tablici 2.

**Tablica 2.** Usporedba uzgoja na čvrstim supstratima (SSF) i submerznog uzgoja (SLF) (Mitchell i sur., 2002).

Uzgoj na čvrstim supstratima (SSF)	Submerzni uzgoj (SLF)
Za dobivanje nekih proizvoda pogodna je samo mala vlažnost. Nije primjenjivo za uzgoj organizama koji trebaju slobodnu vodu.	Može se koristiti za širok raspon proizvoda koje proizvode različiti mikroorganizmi. Za mnoge proizvode najbolja je proizvodnja u SLF.
Medij je relativno jednostavan (npr. zrno) i neobrađen. Sadrži sve potrebne hranjive sastojke, ili se dodatno vlaži mineralnom otopinom. Predobrada je jednostavna kao npr. meljava ili kuhanje. Međutim, supstrat može biti promjenljiv.	Medij često sadrži veći broj visokoobrađenih sastojaka i zato je skuplji. Neobrađene sastojke često treba obraditi radi ekstrakcije i otapanja hranjivih tvari. Definirana podloga omogućuje dobru reproducibilnost.
Niska dostupnost vode pomaže selekciji i prevenciji rasta kontaminanata.	Aktivitet vode je obično vrlo visok i razni kontaminanti mogu dobro rasti.
Hranjive podloge su koncentrirane i omogućuju uporabu manjih bioreaktora, što donosi veću volumetrijsku produktivnost, čak i kod nižih prinosa biomase i brzina rasta.	Hranjive podloge su razrijeđene i zato zauzimaju veće volumene, što uzrokuje manju volumetrijsku produktivnost.
Visoke koncentracije supstrata mogu dati visoke koncentracije produkta.	Visoke koncentracije supstrata mogu dovesti do reoloških problema. Zato mogu biti potrebni sustavi za prihranjivanje.
Aeracija zahtijeva manje energije jer su niži tlakovi. Prijenos plina je lakši jer čestice imaju veliku površinu.	Može zahtijevati visoke tlakove zraka. Prijenos plina iz plinovite u tekuću fazu je spor, može biti ograničavajući faktor.
Nemoguće je miješanje unutar čestica i rast može biti limitiran difuzijom nutrijenata.	Moguće je snažno miješanje, a difuzija nutrijenata najčešće nije limitirajuća.
Mogućnost odvođenja metaboličke topline je ograničena, što vodi do problema pregrijavanja.	Visoki udio vode i veća razrijeđenost olakšavaju regulaciju temperature.
Kontrola procesa je otežana zbog poteškoća s on-line mjerenjem i mjerenjem biomase. Teško je dodavati sastojke tijekom procesa.	Dostupni su mnogi on-line senzori i razvijaju se novi senzori. Može se dodavati sastojke radi kontrole procesa.
Downstream-procesi mogu biti jednostavniji jer su produkti koncentriraniji. Međutim ekstrakti se mogu kontaminirati sastojcima supstrata.	Downstream-procesi zahtijevaju uklanjanje velikih volumena vode i skupi su. Međutim uz definirane podloge olakšano je pročišćavanje proizvoda.
Kinetika rasta i fenomeni transporta su slabo istraženi.	Dostupno je mnogo informacija o kinetici i transportu, koje daju smjernice za dizajn i rad bioreaktora.

## 2.2. Supstrati i sirovine za SSF

Sirovine za uzgoj na čvrstim supstratima uglavnom su poljoprivrednog porijekla. Često se samo minimalno obrađuju, tako da se krupniji poljoprivredni ostaci samo melju ili sjeckaju. To ponekad vodi do problema heterogenosti: na primjer, ako gomoljastu biljku usitnimo, neke čestice će potjecati iz unutrašnjosti gomolja, a druge će potjecati od kore, pa će čestice biti različitog sastava. Kvaliteta i sastav se također mogu razlikovati između šarži budući naime, svaka biljka ima specifična genetička obilježja i raste u specifičnoj mikrookolini. Razlike postoje i između različitih berbi. Nadalje, uvjeti predobrade, npr. prilikom želatinizacije škroba i razaranja kristalne strukture celuloze, ne moraju se jednako odraziti na sve čestice, što može utjecati na kasniji rast mikroorganizama (Mitchell i sur., 2002).

Mitchell i sur. (2002) svrstavaju sirovine za SSF u 3 skupine, a kao kriterij uzimaju glavne izvore ugljika koje te sirovine sadrže:

- škrobne sirovine (sadrže škrob kao glavni izvor ugljika);
- lignocelulozne sirovine (sadrže celulozu i lignocelulozu kao glavni izvor ugljika);
- sirovine koje sadrže uglavnom topljive šećere.

### 2.2.1. Škrobne sirovine

Samo mikroorganizmi koji posjeduju amilaze mogu koristiti škrob kao supstrat, a najbolje će ga razgraditi kombinacija glukoamilaza i  $\alpha$ -amilaza (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berovič., 2003). Škrobne sirovine korištene u SSF-procesima uključuju rižu, manioku (lat. *Manihot esculenta*, eng. cassava) (Slika 2), pšenične i rižine mekinje koje još sadrže ostatke zrna, krupicu manioke, kukuruznu krupicu, sjemenke heljde, ostatke batata (eng. sweet potato) i bananinu krupicu. Neke od ovih sirovina, poput riže, predstavljaju kompletnu hranjivu podlogu za rast mikroorganizama. Međutim drugima treba dodati neke nutrijente (npr. manioki se dodaje izvor dušika).

Za škrobne sirovine može biti potrebna predobrada, koja može uključivati različite postupke (Mitchell i sur., 2002):

- kuhanje ili parenje radi želatinizacije škroba;
- meljava, struganje ili sjeckanje radi usitnjavanja čestica;
- „perlanje“ (eng. pearling) radi pretvorbe finog praha u čestice promjera više milimetara,
- lomljenje zrna riže ili pšenice, kako bi se unutrašnjost učinila dostupnijom.

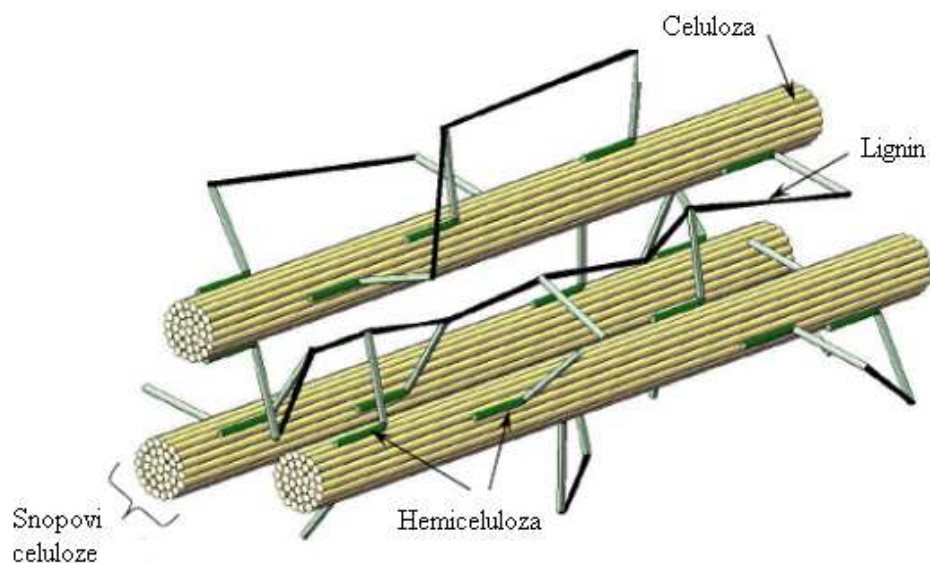
Problem koji se javlja kod škrobnih sirovina je ljepljivost, što može dovesti do aglomeracije čestica. To onemogućava pristup zraku i tako ometa rast radnog mikroorganizma (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović., 2003).



**Slika 2.** Manioka (lat. *Manihot esculenta*, eng. cassava) (Anonymus 4, 2015; Anonymus 5, 2015)

### 2.2.2. Lignocelulozne sirovine

Istraživani su različiti SSF-procesi u kojima su korištene lignocelulozne sirovine kao što su npr. slama pšenice i riže, kukuruzovina, pšenične mekinje, pulpa šećerne repe i drvo (Mitchell i sur., 2002). Glavne sastojke lignoceluloznih materijala čine 3 prirodna polimera, a to su celuloza, hemiceluloza i lignin, koji tvore kompleksnu strukturu (Slika 3) (Lacković, 2012; Adapa i sur., 2009).



**Slika 3.** Struktura lignoceluloznih materijala (Adapa i sur., 2009).



Neki SSF-procesi uključuju razgradnju celuloze, a u tom slučaju se koriste radni mikroorganizmi koji mogu proizvesti celulolitičke enzime. Za učinkovitu razgradnju celuloze, potrebna je sinergistička aktivnost više celulaza (egzo-  $\beta$ -1,4-glukanaze, endo-  $\beta$ -1,4-glukanaze i  $\beta$ -glukozidaze) (Mitchell i sur., 2002; Lacković, 2012). Proveden je velik broj istraživanja SSF-procesa na lignocelulozi radi proizvodnje celulaza i drugih hidrolitičkih enzima (Mitchell i sur., 2002).

Velik broj istraživanja SSF-procesa na lignocelulozi bio je usmjeren na obogaćivanje sirovine proteinima kako bi se dobila krmiva za preživače, ili na proizvodnju celulaza i drugih hidrolitičkih enzima (Mitchell i sur., 2002).

Cilj nekih drugih procesa je obogaćivanje lignoceluloznih sirovina proteinima kako bi se dobila krmiva za preživače, (Mitchell i sur., 2002) pa se preferira razgradnja lignina, dok se razgradnja celuloze i hemiceluloze nastoji svesti na minimum. Tako se povećava probavljivost lignoceluloznih materijala. Glavni enzim koji sudjeluje u razgradnji lignina je lignin-peroksidaza. Obzirom da lignin ne može biti jedini izvor ugljika i energije, lignolitički fungi također razgrađuju i dio celuloze i hemiceluloze (Mitchell i Berović, 2003).

Lignocelulozne sirovine obično zahtijevaju značajnu predobradu, da bi se razorila struktura molekula celuloze i lignina. Sirovine se melju do veličine čestica 1-2 mm radi razaranja staničnih stijenci i povećanja površine. Pored toga se parenjem pod povišenim tlakom razara struktura celuloze, a ponekad se uz to provodi i kemijska predobrada dodatkom kiseline ili lužine (Mitchell i sur., 2002).

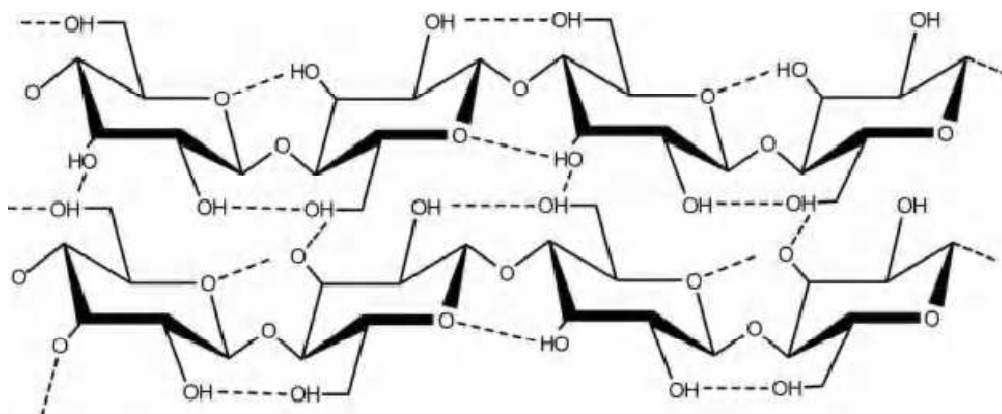
Pored lignina, celuloze i hemiceluloze, sastoje se od niza manje zastupljenih komponenata, kao što su proteini, terpenska ulja, masne kiseline i njihovi esteri te anorganske tvari (uglavnom spojevi dušika, fosfora i kalija) (Lange, 2007). Međutim, zbog različitih ekoloških i genetičkih čimbenika, udjeli navedenih jedinica razlikuju se od sirovine do sirovine (Sluiter i sur., 2010).

Kombinirani učinak triju najzastupljenijih komponenata, celuloze (40 - 50%), hemiceluloze (25 - 35%) i lignina (15 - 20 %), daje jedinstvena svojstva sirovini (Baček i sur., 2012), pa lignocelulozne sirovine karakterizira velika čvrstoća, zapaljivost i biorazgradivost.

### 2.2.2.1. Celuloza

Celuloza,  $(C_6H_{10}O_5)_n$ , je polisaharid D-glukoze, netopljiv u vodi i organskim otapalima. Glukozne jedinice unutar lanaca celuloze povezane su  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom (Slika 4),

dok se hidroksilne skupine međusobno povezuju tvoreći vodikove veze koje stabiliziraju strukturu celuloze, budući da omogućavaju formiranje kristalne strukture (Palonen, 2004). Stupanj polimerizacije celuloze je broj glukoznih jedinica povezanih unutar molekule, a ovisi o vrsti sirovine i obično je između 7000 i 15000.



**Slika 4.** Kemijska struktura celuloze (crtkane linije predstavljaju vodikove veze)  
(Kubicek, 2013).

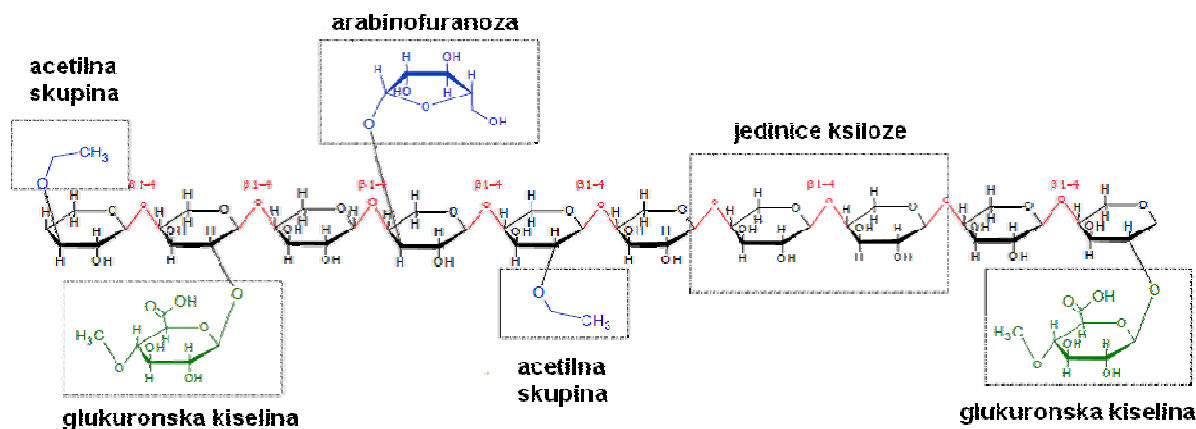
Unutar stanične stijenke sirovina biljnog podrijetla, celuloza je povezana s hemicelulozom i ligninom. Zbog toga oslobađanje celuloze u cilju dobivanja fermentabilnih šećera (glukoze) iz takve strukture često predstavlja tehnološki izazov (Palonen, 2004).

### 2.2.2.2. Hemiceluloza

Naziv hemiceluloza obuhvaća necelulozne i nepektinske heteropolisaharide stanične stijenke, koji se međusobno razlikuju prema ugljikohidratima koji čine njihovu glavnu okosnicu (Wyman i sur., 2005). Ovisno o vrsti biljke, fazi razvoja te vrsti tkiva javljaju se različiti oblici hemiceluloze, u čiji sastav, osim najzastupljenijih šećera D-manoze i D-ksiloze, ulaze i D-glukoza, D-galaktoza, L-arabinoza, te glukuronska, octena, ferulinska kiselina i manani.

U mekom drvetu glavnu okosnicu izgrađuje manaza, na čije se lance nadovezuju jedinice glukoze i galaktoze, dok u tvrdom drvetu i travama okosnicu predstavljaju lanci ksilana povezani s bočnim lancima arabinoze i glukuronske kiseline (Hames, 2009). Zahvaljujući bočnim grupama vezanim na glavnu okosnicu omogućeno je kovalentno vezanje hemiceluloze i lignina. Iako između celuloze i hemiceluloza ne postoji kovalentna veza, kumulativni učinak vodikovih veza i van der Waalsovih sila omogućuje njihovu povezanost. Stupanj polimerizacije hemiceluloze je obično između 70 i 200 (Palonen, 2004). Na slici 5

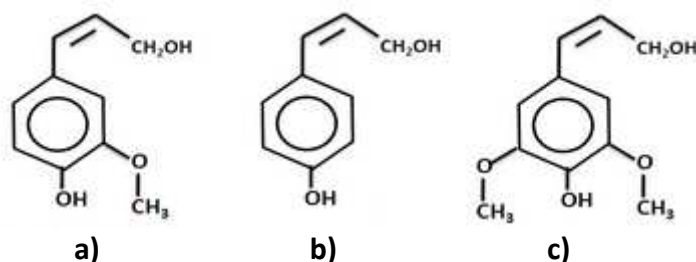
prikazan je ksilan, dominantni oblik hemiceluloze većine biljnih vrsta koji izgrađuje 1/3 biljne biomase (Wyman i sur., 2005). Okosnicu ksilana čine jedinice D-ksilopiranoze povezane  $\beta$ -1,4-glikozidnom vezom, dok grupe u bočnim lancima mogu biti različite.



**Slika 5.** Struktura ksilana (Mussatto i sur., 2009).

### 2.2.2.3. Lignin

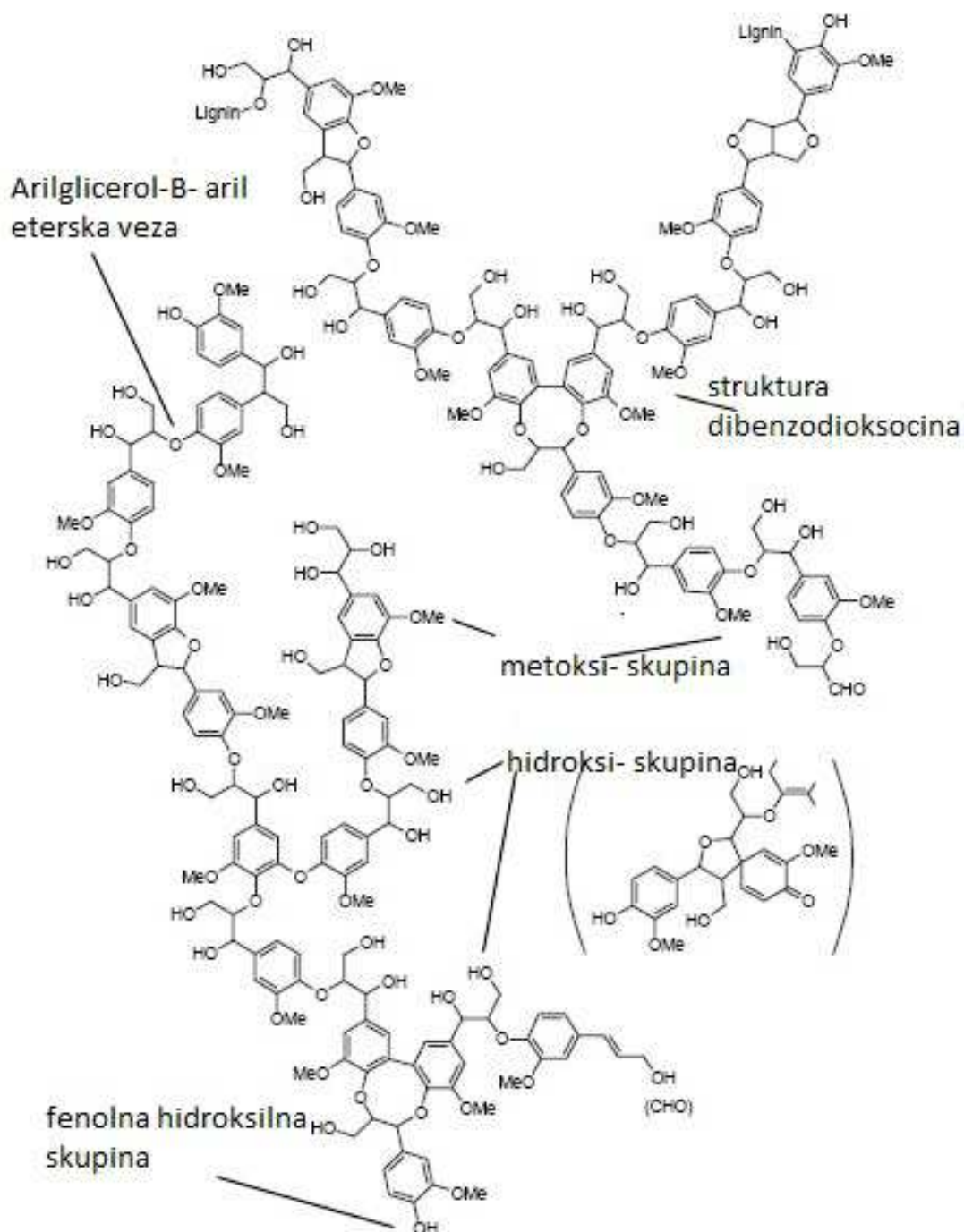
Lignin je naziv za veliku skupinu aromatskih polimera koji nastaju međusobnim povezivanjem 4-hidroksifenilpropana (Vanholme, 2010). Biljke nakon završenog rasta sintetiziraju lignin (Hames, 2009), ali njegova biosinteza može biti inducirana uslijed raznih stresnih biotičkih i abiotičkih uvjeta (ranjavanje, infekcija patogenima, metabolički stres ili poremećaj funkcije stanične stijenke) (Vanholme, 2010), iz čega se može zaključiti da lignin u staničnoj stijenci, osim strukturne ima i zaštitnu ulogu. Prekursori fenilpropanskih jedinica su koniferil-alkohol, *p*-kumaril-alkohol i sinapil-alkohol (Slika 6).



**Slika 6.** Prekursori kod biosinteze lignina (Sederoff i sur., 1999; Anonymus 6, 2014):

- a) 4-hidroksi-3-metoksicinamil-alkohol (koniferil-alkohol);
- b) 4-hidroksicinamil-alkohol (*p*-hidroksicinamil-alkohol, kumaril-alkohol);
- c) 4-hidroksi-3,5-dimetoksicinamil-alkohol (sinapil-alkohol).

Unatoč činjenici da je lignin hidrofoban, hidroksi- i metoksi-skupine unutar njegove strukture omogućavaju interakcije s celulozom (Palonen, 2004). Struktura lignina je nepravilna i ovisi o biljnoj vrsti. Slika 7 prikazuje najučestaliju strukturu i funkcionalne grupe lignina mekog drveta.



**Slika 7.** Struktura lignina u mekom drvetu; istaknute su najzastupljenije funkcionalne grupe (Palonen, 2004).

### 2.2.3. Sirovine koje sadrže uglavnom topljive šećere

Čvrsti supstrati sa visokim udjelom topljivih šećera uključuju groždani trop, slatki sirak (lat. *Sorghum saccharatum*, eng. sweet sorghum), krmnu i šećernu repu, otpatke ananasa, mahune rogača i pulpu kave (Mitchell i sur., 2002).



**Slika 8.** Slatki sirak (lat. *Sorghum saccharatum*) (Anonymus 7, 2015)

## 2.3. Svojstva čestica sirovine u SSF-bioreaktoru

Najvažnije fizikalno svojstvo čestica je njihova veličina, o kojoj ovisi omjer površine i volumena supstrata, kao i veličina međučestičnog prostora (Mitchell i sur., 2002). Mikroorganizam se inokulira na površinu čestica i zato u početku može rasti samo površinski. Zato omjer površine i volumena čestice određuje koliki dio supstrata će biti dostupan mikroorganizmu. S druge strane, prostor među česticama je također bitan. Ako je on malen, onda se može brzo popuniti micelijem funga, što uvelike ograničava difuziju i uzrokuje velike padove tlaka u aeriranim sustavima. Također, ako su prisutne čestice različitih veličina, onda će manje čestice popunjavati prostor između većih čestica, smanjujući tako ukupni volumen međučestičnog prostora. Stoga optimalna veličina čestica predstavlja kompromis između dostupnosti nutrijenata i pristupa kisika. Najčešća veličina čestica korištenih u SSF-sustavima je u rasponu od 1 mm do 1 cm (Mitchell i sur., 2002).

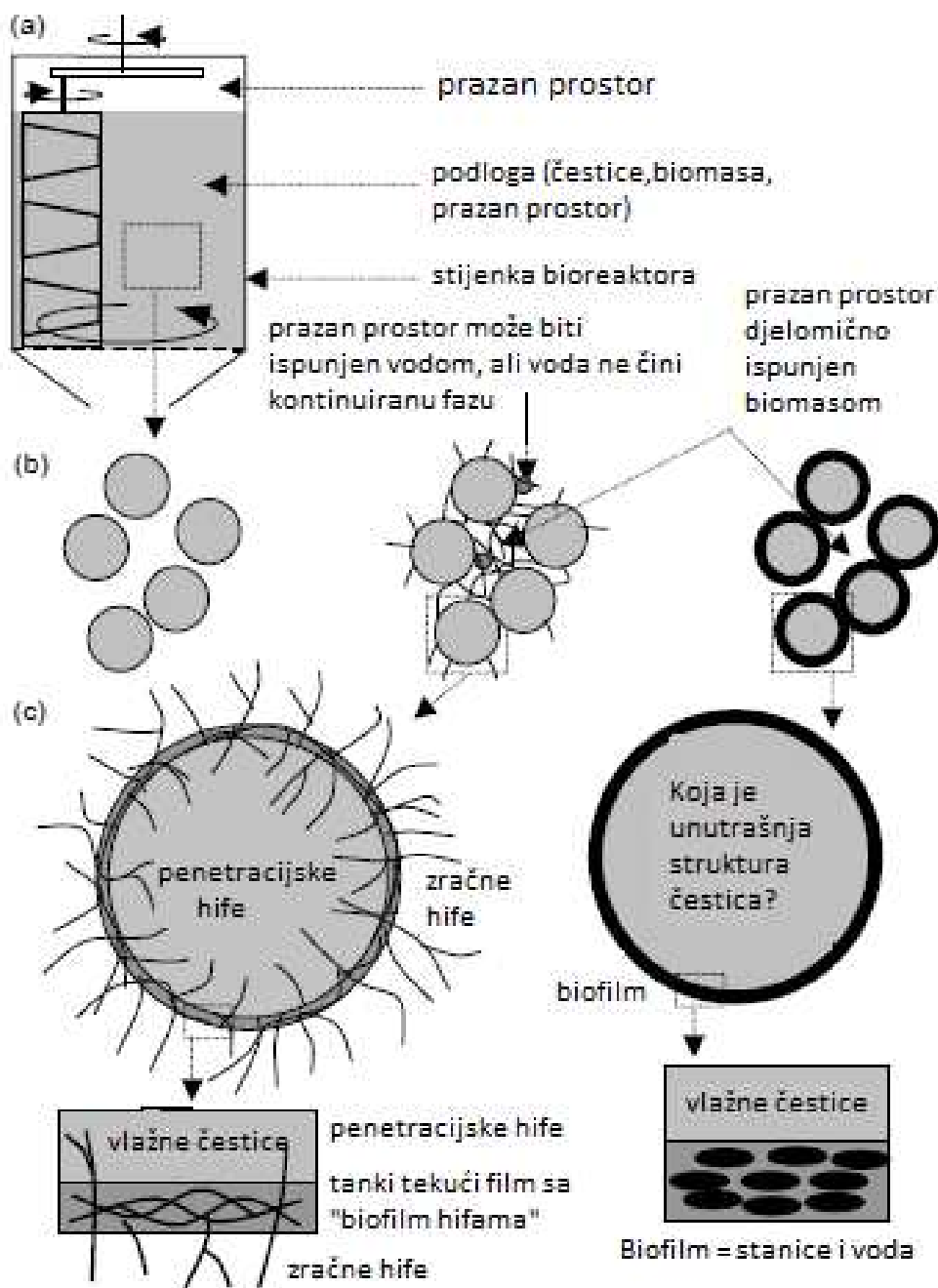
Oblik čestica, zajedno s njezinom veličinom utječu na omjer površine i volumena čestice supstrata. Čestice s ravnim površinama, kao što su kocke, ravne ploče ili čak izdužene pravokutne prizme, mogu imati velike omjere površine i volumena, ali one imaju tendenciju da leže zajedno, dok je međučestični porostor vrlo mali. Konzistencija i čvrstoća čestica je bitna, jer se supstrat može deformirati pod težinom supstrata koji je iznad njega, pa međučestični prostor nestaje (Mitchell i sur., 2002).

Čestice čvrstog materijala u SSF-sustavima sadrže jednu ili više vrsta polimera koji im daju čvrstoću (Lacković, 2012). Ako je strukturni polimer ujedno i izvor ugljika i energije, tada će se njegovom razgradnjom narušiti struktura čestica, odnosno njihova veličina i svojstva. To se neće dogoditi u slučajevima kad polimer predstavlja samo matriks unutar kojeg je impregniran topljivi supstrat (Mitchell i sur., 2002).

Pri rastu jednostaničnih mikroorganizama međustanični prostori su jasno definirani, a biofilm se tretira kao dio čestice. Kod uzgoja filamentoznih funga razlikujemo tzv. zračne hife, hife koje na površini čestice tvore biofilm te penetracijske hife. Mreža zračnih hifa raste u međučestičnom prostoru, unutar plinovite faze, a penetracijske hife su one koje su prodrle u čvrsti matriks. Hife koje tvore biofilm nalaze se iznad čvrste površine, ali su potopljene u tekući sloj na površini čestice. Ovisno o doseg ovog filma, stabiliziranog mrežom hifa, hife koje tvore biofilm mogu predstavljati značajni udio ukupne biomase (Mitchell i sur., 2006).

Površina čestica, koja predstavlja granicu između penetracijskih hifa i biofilma, može biti nejasna, posebno u slučaju kada mikroorganizam razgrađuje strukturni polimer. U svakom slučaju, najveća koncentracija biomase funga je obično direktno iznad i direktno ispod površine čestice, gdje su istovremeno dostupni i nutrijenti iz supstrata i kisik iz plinovite faze (Mitchell i sur., 2006).

Na Slici 9 možemo vidjeti fizikalnu strukturu SSF-sustava unutar bioreaktora, odnosno prostorni raspored biomase (Mitchell i sur., 2006; Lacković, 2012).



**Slika 9.** Faze prisutne u SSF-bioreaktoru (Mitchell i sur., 2006; Lacković, 2012):

- makroskopski prikaz;
- mikroskopski prikaz – s lijeva na desno slike predstavljaju neinokulirani supstrat, rast filamentoznih funga i jednostaničnih organizama poput kvasaca i bakterija;
- detaljniji mikroskopski prikaz koji prikazuje poprečni presjek čestice.



## **2.4. Tipovi kultura i mikroorganizmi za uzgoj na čvrstim supstratima**

### **2.4.1. Tipovi kultura u SSF-procesima**

U različitim SSF-procesima primjenjuju se različiti tipovi kultura i postoje različiti pristupi obzirom na primjenu aseptičnih postupaka. U literaturi se navode četiri mogućnosti (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003):

1. Monokultura
2. Definirana mješovita kultura
3. Sekvencijalna kultura
4. Nedefinirana mješovita kultura.

Kod primjene monokulture, supstrat se pasteurizira ili sterilizira te potom naciepljuje čistom kulturom. Tijekom uzgoja se mogu koristiti aseptične tehnike kako bi se spriječila kontaminacija. U nekim slučajevima sami uvjeti uzgoja djeluju selektivno i na taj način sprečavaju rast kontaminanata, a radni mikroorganizam može brzo rasti pa kontaminanti nisu kompetitivni. U ovakvom slučaju, proces može provoditi i nekvalificirana radna snaga.

Prilikom primjene definirane mješovite kulture, supstrat se pasteurizira ili sterilizira, te naciepljuje sa više od jedne čiste kulture. Ovo je pogodno kod kompleksnih supstrata i u slučajevima kada različiti sojevi mikroorganizma koriste različite izvore ugljika.

Sekvencijalna kultura je tip mješovite kulture u kojoj se drugi mikroorganizam dodaje nakon što je prvi mikroorganizam prestao rasti. Ova metoda povećava iskorištenost nutrijenata u sirovini. Primjer upotrebe sekvencijalne kulture je proizvodnja celulolitičkih enzima na rižinoj slami i pšeničnim mekinjama, u kojoj je sukcesivno kultivirano pet različitih fungalnih sojeva, čime se postižu veći prinosi enzima.

Nedefinirana mješovita kultura se postiže tako da se omogući rast prirodne mikroflore sirovine ili se inokulira miješanim inokulumom koji je pripremljen tradicionalnim metodama. Pri ovakvom tipu kulture fermentacijski uvjeti osiguravaju selekciju željenih skupina mikroorganizama. Ovakvi procesi obično se primjenjuju u proizvodnji tradicionalne fermentirane hrane ili za obradu otpada.

### 2.4.2. Mikroorganizmi koji se koriste u SSF-procesima

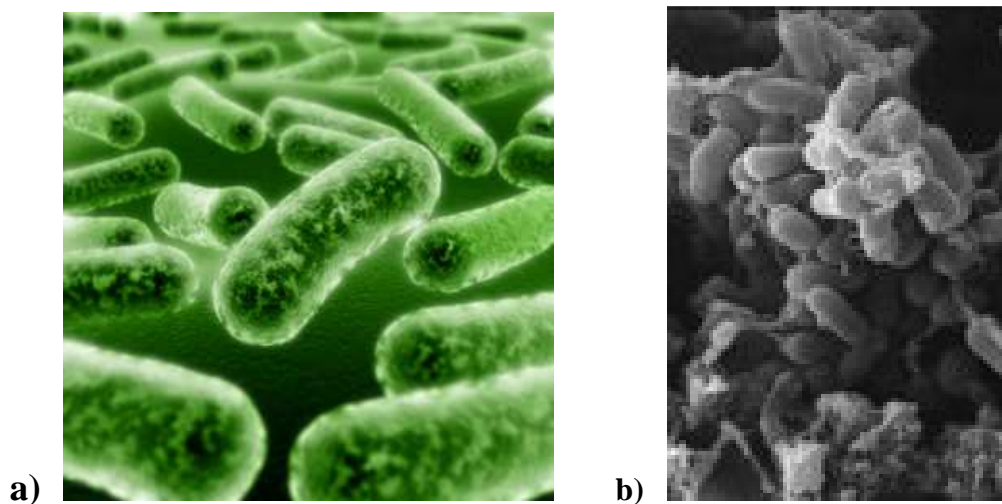
S obzirom na relativno malu količinu slobodne vode u supstratima koji se koriste za SSF, aktivitet vode je niži nego kod submerznog uzgoja. Zbog toga se u većini SSF-procesa koriste fungi, iako velik broj procesa uključuje bakterije i kvasce (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003). Kvasci imaju najmanju važnost dok su filamentozni fungi najznačajniji za SSF-procese (Mitchell i Berović, 2003).

#### 2.4.2.1. Kvasci u SSF-procesima

Kvasci rastu na čvrstim supstratima uglavnom samo kao manjinski pripadnici mikroflore, kao npr. u ranim fazama siliranja u kojem prevladavaju laktobacili. Monokulture kvasca *Saccharomyces cerevisiae* koriste se u različitim procesima proizvodnje etanola fermentacijom polučvrste podloge (eng. semi-solid fermentation) na groždanom tropu te pri proizvodnji etanola u SSF postupcima iz slatkog sirka, šećerne repe i stočne repe. Kvasci *Endomycopsis fibuligera* i *Schwanniomyces castelli* korišteni su za povećanje udjela proteina na raznim čvrstim škrobnim sirovinama (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

#### 2.4.2.2. Bakterije u SSF-procesima

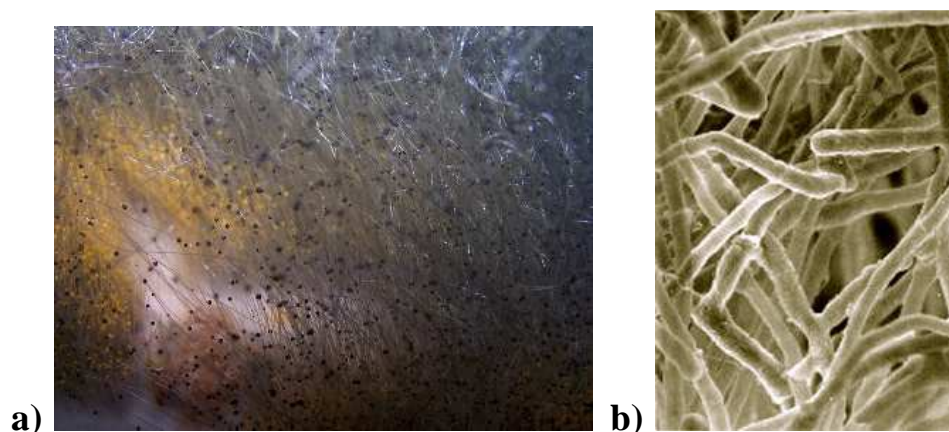
Bakterije mogu biti prevladavajući ili manjinski mikroorganizmi u raznim SSF-procesima. Laktobacili su glavni mikroorganizmi pri siliranju. Termofilne bakterije prevladavaju u ranim fazama kompostiranja, prije nego što se razviju termofilni aktinomiceti i fungi. *Bacillus subtilis* ima glavnu ulogu u proizvodnji japanske fermentirane hrane *natto*, gdje formira ljepljivi sloj na zrnima soje. Bakterije *Lactobacillus plantarum* i *Propionibacterium shermanii* (Slika 10) korištene su za fermentaciju i konzerviranje zrna žita s visokim udjelom vlage, u procesu sličnom siliranju (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).



**Slika 10.** a) bakterija *Lactobacillus plantarum* (Anonymous 8, 2015);  
b) bakterija *Propionibacterium shermanii* (Anonymous 9, 2015).

#### 2.4.2.3. Filamentozni fungi u SSF-procesima

Filamentozni fungi predstavljaju najvažniju skupinu mikroorganizama za uzgoj na čvrstim supstratima. Među mnogobrojnim korištenim fungima su vrste iz rodova *Aspergillus*, *Rhizopus*, celulolitički funge poput *Chaetomium cellulolyticum* i *Trichoderma reesei* te ligninolitički fungi kao što su gljive bijelog truljenja (eng. white rot fungi) (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003). Slika 11 prikazuje neke filamentozne funge.



**Slika 11.** Filamentozni fungi: a) *Rhizopus stolonifer* (Olbrantz, 2015);  
b) *Trichoderma reesei* (Anonymous 10, 2015).

Primjenom filamentoznih funga proizvodi se velik broj različitih proizvoda, poput stočne hrane s povećanim udjelom proteina, raznih enzima, organskih kiselina, antibiotika, pigmenata, aroma i dr., a također se razgrađuju pojedini štetni spojevi. Zahvaljujući svom hifalnom rastu i fiziološkim svojstvima, filamentozni fungi su idealni za primjenu u SSF-procesima. Mnogi fungi u prirodi rastu na čvrstim materijalima kao što je drvo ili lišće, dajući pritom velike prinose enzima (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

Fiziološka svojstva funga koja pogoduju njihovoj primjeni u SSF su (Mitchell i sur., 2002):

1. rast u uvjetima niskih aktiviteta vode i niskih pH-vrijednosti,
2. proizvodnja brojnih hidrolitičkih enzima
3. produkcija spora.

U nekim SSF-sustavima može se postići kombinacija niskog aktiviteta vode i niske pH-vrijednosti, čime se ostvaruju selektivni uvjeti koji sprečavaju kontaminaciju većinom bakterija i kvasaca, a pogoduju rastu filamentoznih funga.

Nadalje, mnogi filamentozni fungi proizvode niz hidrolitičkih enzima, kojima razgrađuju makromolekule iz čvrstih supstrata. Amilaze i celulaze su najvažniji enzimi za rast na čvrstim supstratima poljoprivrednog porijekla, dok proteaze i lipaze pomažu razgradnju i penetraciju.

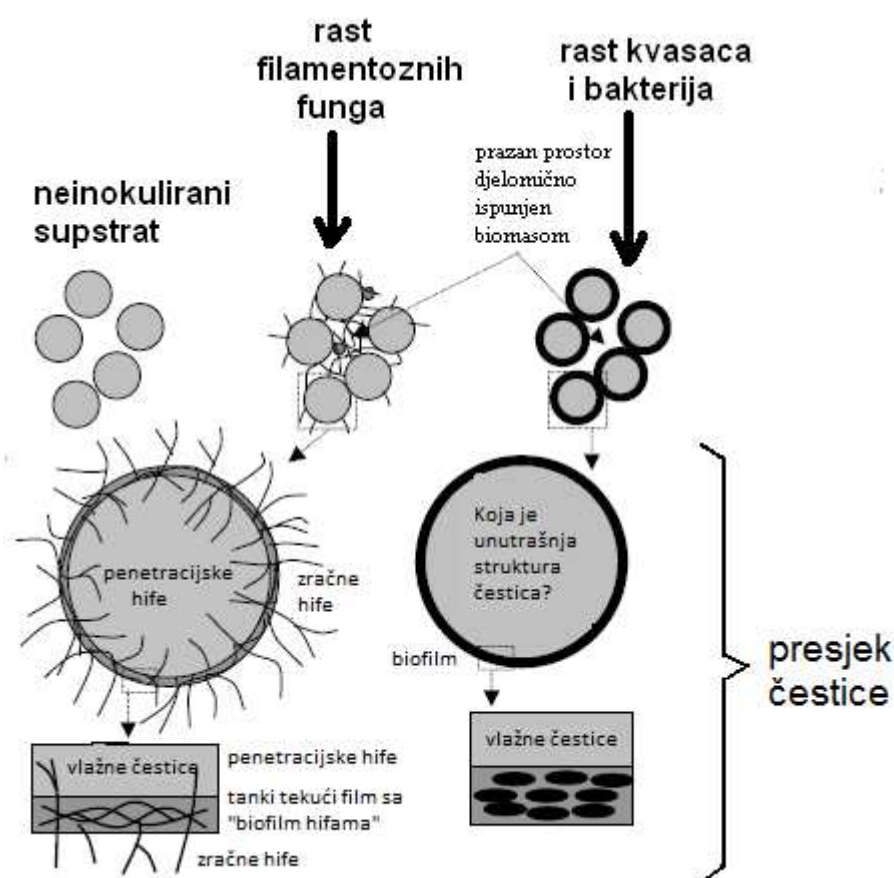
Također, filamentozni fungi većinom su sporogeni organizmi, te se inokuliraju u obliku spora (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003). Takav inokulum ima svojih prednosti i mana (Mitchell i Berović, 2003). Prednost takvih inokuluma je da se lako pripremaju i mogu se skladištiti na dulje vrijeme nego što je slučaj sa vegetativnim stanicama. Ovo pridonosi fleksibilnosti procesa, jer ne treba pridavati toliku važnost usklađivanju proizvodnje inokuluma s ostatkom procesa (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003). Nedostatak spora je to što su one metabolički inaktivne te je potrebno više sati za germinaciju. Zato je dobro neposredno prije inokulacije uključiti u proces i dodatni korak germinacije u tekućoj podlozi. Koncentracija inokuluma je obično  $10^4 - 10^7$  spora po gramu supstrata, ovisno o organizmu. Najbolji se rezultati dobivaju kad je inokulum dovoljno velik da se koloniziraju skoro sve čestice supstata, međutim prevelik inokulum može i usporiti germinaciju (Mitchell i Berović, 2003).

Sporulacija tijekom fermentacije nije poželjna pa se kontrolira odabirom uvjeta (npr. miješanje sprečava sporulaciju) (Mitchell i sur., 2002).

### 2.4.3. Način rasta mikroorganizama u SSF-procesima

#### 2.4.3.1. Način rasta kvasaca i bakterija u SSF-procesima

Jednostanični organizmi poput kvasaca i bakterija rastu unutar tankog vodenog filma na površini čestica čvrstog supstrata, tvoreći tzv. biofilm. Međustanični prostori ispunjeni su vodom (Slika 12), što biofilmu daje konzistenciju guste paste (Mitchell i sur., 2006).



**Slika 12.** Rast filamentoznih funga i jednostaničnih organizama poput kvasaca i bakterija u SSF-bioreaktoru (Mitchell i sur., 2006).

#### 2.4.3.2. Način rasta filamentoznih funga u SSF-procesima

Filamentozni fungi su dobro prilagođeni za širenje po površini čvrstog supstrata i prodiranje unutar njegovih čestica (Slika 12). Na čvrstim površinama fungi tvore kolonije koje se zatim radijalno šire, zahvaljujući vršnom produžavanju hifa na vanjskim rubovima kolonija. U SSF-sustavu, kolonije koje potječu od susjednih spora ubrzo se spoje, povećavajući hifalnu gustoću unutar micelija. Gustoća hifa unutar kolonije ovisi o učestalosti grananja hifa, na što utječe više faktora, uključujući i dostupnost nutrijenata. Fungalne hife se također mogu dovoljno produžiti da koloniziraju nova područja supstrata, ili da premoste područja niske dostupnosti nutrijenata, premda ova sposobnost varira među vrstama (Mitchell i sur., 2002).

U odnosu na jednostanične mikroorganizme, hifalni rast također daje fungima mnogo veću sposobnost prodiranja u supstrat. Nutrijenti u unutrašnjosti supstrata su u početku nedostupni, no kasnije ih penetracijske hife mogu doseći. Stanične stijenke biljaka predstavljaju veliku prepreku penetraciji hifa. Potrebno je razoriti biljne stanice, čak i pri primjeni celulolitičkih mikroorganizama, budući da su unutrašnje strane staničnih stijenki najpodložnije celulolitičkom djelovanju. Penetracija funga može biti mehanička i enzimska. Vrste funga koje najlakše penetriraju u lignocelulozne supstrate su gljive bijelog truljenja i gljive smeđeg truljenja, a u tome im pomaže njihov enzimski sustav. Gljive bijelog truljenja (eng. white rot fungi) koriste i lignin i polisaharide, dok gljive smeđeg truljenja (eng. brown rot fungi) razgrađuju polisaharide i uklanjaju samo malo lignina. Najveća prednost penetracije je bliski kontakt hifa s nutrijentima u unutrašnjosti supstrata na kojem rastu, što znatno skraćuje udaljenost pri kojoj se procesi difuzije trebaju odviti. Ovo je najvažnije u kasnijim fazama uzgoja, kad su nutrijenti s površine supstrata već iscrpljeni. Međutim, brzi rast micelija unutar supstrata obično je spriječen zbog niske dostupnosti kisika, budući da većinu kisika iskoristi micelij na površini. Pukotine u supstratu potiču rast u unutrašnjosti čestica, povećavajući dostupnost kisika (Mitchell i sur., 2002).

## **2.5. Fizikalni čimbenici koji utječu na rast mikroorganizama u SSF**

Parametri okoline koji imaju važan učinak kod rasta mikroorganizama u SSF-procesu su dostupnost vlage, pH-vrijednost, temperatura, sastav plinova te koncentracije supstrata i produkta (Mitchell i sur., 2002).

### **2.5.1. Dostupnost vlage**

Dostupnost vlage u SSF-sustavu može se izraziti na dva načina - u obliku masenog udjela vode ili aktiviteta vode u čvrstom supstratu. Aktivitet vode izravnije utječe na mikrobni rast, no s druge strane maseni udio vode je mnogo lakše izmjeriti. Maseni udio vode,  $w(\text{H}_2\text{O})$ , je naprosto postotak vode u ukupnoj masi materijala. Nasuprot tome, aktivitet vode,  $a_w$ , je omjer tlaka vodene pare materijala i tlaka vodene pare čiste vode pri istoj temperaturi. Može se reći da je aktivitet vode u nekom sustavu zapravo udio molekula vode koje imaju svojstva čiste vode i to je mjera za količinu vode raspoložive mikroorganizmu. Slaboj dostupnosti vode za mikroorganizme u SSF-sustavima pridonose osmotske sile nastale zbog sastojaka otopljenih u supstratu, kao i učinci matriksa zbog kapilarnih sila i površinske napetosti (Mitchell i sur., 2002).

Različiti supstrati imaju različite kapacitete zadržavanja vode i zato količina vode koju mogu zadržati prije nego slobodna voda postane uočljiva može izrazito varirati. Stoga se u različitim SSF-procesima maseni udjeli vode u supstratu kreću između 30 % i 80 %. Također, odnos aktiviteta vode i masenog udjela vode za većinu čvrstih supstrata nije linearan u rasponu masenih udjela vode prisutnih u SSF-procesima. Tako velike promjene masenog udjela vode obično rezultiraju samo malim promjenama aktiviteta vode.

Učinci vlažnosti nisu ograničeni samo na one koji izravno utječu na fiziologiju mikroorganizma. Jedan od najvažnijih neizravnih učinaka je promjena svojstava supstrata. Visoke razine vlage mogu istisnuti plinove iz međučestičnih prostora ili uzrokovati aglomeraciju čestica supstrata u nakupine. Obje pojave ograničavaju difuziju plina u međučestičnom prostoru. Visoke razine vlage također mogu izdvojiti topljive nutrijente iz čestica supstrata. S druge strane, visoke razine vlage će dovesti do bubrenja supstrata, što povećava poroznost te tako omogućuje bolju difuziju i djelovanje enzima, kao i bolju

penetraciju micelija. Zbog niskih udjela vlage može se desiti da inhibicijski metabolički nusproizvodi ranije dosegnu inhibicijske koncentracije, ograničavajući tako rast (Mitchell i sur., 2002).

### **2.5.2. pH-vrijednost**

Mikrobni rast može uzrokovati značajne promjene pH-vrijednosti supstrata. Proizvodnja kiselina uslijed nepotpune oksidacije supstrata ili potrošnja amonijevih iona uzrokovat će sniženje pH-vrijednosti, dok će oslobađanje amonijaka deaminacijom uree ili drugih amina povećati pH-vrijednost. Intenzitet promjene pH-vrijednosti ovisi o metaboličkoj aktivnosti mikroorganizma i puferskom kapacitetu čvrstog supstrata. Može se dogoditi da pH dosegne vrijednosti kod kojih je rast mikroorganizma inhibiran. U svakom slučaju pH je vrlo teško kontrolirati u SSF-sustavima i stoga je poželjna uporaba mikroorganizama koji rastu unutar širokog raspona pH-vrijednosti, te imaju širok opseg optimalnog područja pH-vrijednosti. Većina mikroorganizama može rasti unutar 3 do 4 pH jedinice, dok je rast blizu optimalnog unutar 1 do 1,5 pH-jedinice (Mitchell i sur., 2002).

### **2.5.3. Temperatura**

Tijekom mikrobnog rasta u SSF nakupljaju se značajne količine metaboličke topline. Eksperimentalno je utvrđeno da je tijekom SSF-procesa brzina oslobađanja topline 100 - 300 kJ po kilogramu supstrata po satu. U svakom slučaju, uklanjanje topline iz supstrata je obično neučinkovito, što vodi do uspostavljanja temperaturnih gradijenata i lokaliziranog pregrijavanja supstrata. Temperatura često dostiže vrijednosti koje znatno limitiraju rast ili čak usmrćuju mikroorganizam. Ova nakupljena toplina mora se odmah odvesti, budući da visoke temperature utječu na germinaciju spora, nastajanje nusproizvoda te sporulaciju. Većina mikroorganizama koji se koriste u SSF-procesima su mezofilni i optimalna temperatura za rast im je između 20 i 40 °C, a maksimalna temperatura ispod 50 °C (Mitchell i sur., 2002).



### 2.5.4. Sastav plinova u okolini supstrata

Sastavu plinova u okolini supstrata u SSF-procesima pridodana je određena pažnja, a istraživanja su usmjerena na kisik i ugljikov dioksid. Najveću važnost imaju plinoviti uvjeti u međučestičnim prostorima. Kisik treba difundirati iz međučestičnog prostora u biomasu, a ugljikov dioksid iz biomase u međučestični prostor. Koristan pokazatelj metaboličkog stanja kulture je respiracijski koeficijent (RQ). On je pokazatelj aeracije supstrata, pri čemu visoke RQ vrijednosti ukazuju na fermentativni metabolizam (Mitchell i sur., 2002).

### 2.5.5. Koncentracije supstrata i produkata

Niska dostupnost vlage u čvrstim supstratima čini SSF-sustave vrlo koncentriranima u usporedbi sa submerznim uzgojem. Moguća je inhibicija topljivim nutrijentima, produktima hidrolize makromolekula ili nusproduktima metabolizma. S obzirom na uspostavljanje gradijenata koncentracija u česticama supstrata, koncentracije utvrđene analizom cijelog supstrata nisu one koncentracije kojima je izložen mikroorganizam. Iako u kasnijoj fazi uzgoja koncentracije nutrijenata u unutrašnjosti supstrata mogu biti visoke, koncentracije na njegovoj površini mogu biti dovoljno niske da znatno limitiraju brzinu rasta (Mitchell i sur., 2002).

Na rast i metabolizam u SSF-procesima utječe više važnih faktora vezanih za koncentracije supstrata i produkata (Mitchell i sur., 2002):

- limitacija nutrijentima,
- omjeri različitih nutrijenata,
- inhibicija supstratom,
- katabolička represija,
- inhibicija produktom.

Pritom se može uočiti utjecaj na različite metaboličke funkcije, a rast može bit stimuliran ili limitiran, može biti inducirana sporulacija ili metabolički putevi mogu biti inducirani ili reprimirani.

Budući da dušik predstavlja važan nutrijent u SSF-procesu, mnogi čvrsti supstrati su prilikom pripreme obogaćeni topljivim izvorima dušika. Pri izboru izvora dušika, treba imati na umu da izvor dušika može igrati važnu ulogu u utjecaju na promjene pH-vrijednosti supstrata tijekom uzgoja. Također, treba obratiti pažnju na omjere ugljika i dušika (C:N).

Međutim, ukupni C:N omjeri ne odražavaju nužno relativnu dostupnost izvora ugljika i dušika. Zato optimalni C:N omjeri u SSF-procesima mogu biti dosta različiti nego kod submerznog uzgoja. Nadalje, premda supstrat može sadržavati visoke razine ugljika, da bi se on mogao do kraja iskoristiti potrebna je opskrba izvorom dušika, što može potencijalno dovesti do inhibicije supstratom (Mitchell i sur., 2002).

## 2.6. Mjerenje i kontrola u SSF

### 2.6.1. Procjena udjela biomase

U mikrobnim procesima uobičajeno je pratiti rast radnog mikroorganizma (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

Da bi se koncentracija biomase izravno mjerila, potrebno je biomasu odvojiti od čvrstog materijala (Mitchell i sur., 2006). Pri submerznom uzgoju moguće je uzeti uzorak, odvojiti biomasu centrifugiranjem ili filtriranjem i osušiti biomasu. Međutim, tijekom uzgoja funga na čvrstim supstratima je nemoguće kvantitativno odvojiti biomasu od podloge, jer se fungalni micelij vrlo čvrsto veže za supstrat i prodire u njega. Izravno odvajanje biomase moguće je samo u ovim slučajevima (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003):

- Ako se većina čestice supstrata može enzimski probaviti, što se često odnosi na supstrate koji se sastoje uglavnom od škroba, tada se nakon digestije biomasa može izdvojiti filtracijom.
- U procesima koji uključuju bakterije i kvasce, stanice se mogu isprati sa česticama supstrata i procijeniti brojanjem živih stanica.

Međutim, ukoliko analiziramo ova dva primjera, vidljivo je da se u prvom slučaju radi o određivanju biomase samo na kraju procesa, što nije prihvatljivo jer nema nikakvih informacija o rastu biomase tijekom ostatka procesa. Za drugi navedeni primjer može se pretpostaviti da je nemoguće u potpunosti isprati sve mikroorganizme s česticama, osobito uzevši u obzir različite stupnjeve njihove poroznosti. Zato se može zaključiti da ova dva primjera ne pridonose na zadovoljavajući način određivanju biomase u SSF-procesima.

Problem praćenja biomase u SSF može se riješiti primjenom neizravnih metoda, kao što su mjerenje metaboličkih aktivnosti ili mjerenje udjela odgovarajućih komponenata biomase (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

Prilikom odabira prikladne analitičke metode za određivanje biomase pri uzgoju funga u SSF-bioreaktorima potrebno je odgovoriti na nekoliko pitanja (Mitchell i sur., 2006):

- Je li komponenta koja se mjeri prisutna i u sirovini na kojoj se fungi uzgajaju?
- Koliko je vremena, opreme i kemikalija potrebno za obradu uzoraka?
- U kojoj mjeri se mijenja odnos između koncentracije biomase tijekom fermentacije i analizirane aktivnosti ili komponente biomase?

### 2.6.1.1. Procjena biomase mjerenjem metaboličke aktivnosti

Metaboličke aktivnosti koje se mogu odrediti u svrhu praćenja rasta su potrošnja kisika i nastajanje ugljikovog dioksida do kojih dolazi tijekom mikrobne respiracije. Moguće je mjeriti jedan ili oba navedena parametra. Ako se mjere oba parametra, tada je moguće odrediti respiracijski kvocijent mikroorganizma, koji može dati informacije o njegovom metaboličkom stanju. Ove respiracijske aktivnosti mogu se mjeriti on-line, pomoću infracrvenog analizatora za mjerenje CO<sub>2</sub>, i paramagnetskog analizatora za mjerenje O<sub>2</sub>. Također je moguće uzeti uzorke i analizirati ih plinskom kromatografijom, premda tako ne možemo kontinuirano pratiti razine plinova kao u prethodnom slučaju. Obično se pretpostavlja da se nastanak CO<sub>2</sub> i potrošnja O<sub>2</sub> povezuju s rastom i održavanjem stanica (Mitchell i sur., 2002).

Stoga je korelacijska jednadžba za potrošnju kisika (Mitchell i sur., 2002):

$$\text{OUR} = \frac{d\text{O}_2}{dt} = \frac{1}{Y_{\text{xo}}} \frac{dX}{dt} + m_{\text{o}}X \quad (1)$$

gdje je:

OUR - brzina potrošnje kisika (eng. oxygen uptake rate),

$Y_{\text{xo}}$  - koeficijent konverzije kisika u biomasu,

$m_{\text{o}}$  - brzina potrošnje kisika za održavanje.

Jednadžba za proizvodnju ugljičnog dioksida ima isti oblik (Mitchell i sur., 2002).

### 2.6.1.2. Procjena biomase mjerenjem udjela određenih komponenata biomase

Neizravne metode određivanja biomase temelje se na mjerenju udjela nekih komponenata biomase kao što su ergosterol, glukozamin ili proteini (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003; Mitchell i sur., 2006).

Nedostatak neizravnih metoda je da udjeli proteina, glukozamina i ergosterola u biomasu mogu znatno varirati ovisno o uvjetima uzgoja i starosti kulture, što uvelike otežava određivanje biomase. Zato se tijekom vremena mijenja faktor za preračunavanje udjela ovih komponenata u udio biomase. Za neizravne metode se mora napraviti kalibracija kako bi se

odredio odnos između komponenata koje odrađujemo i biomase. U nekim radovima je kalibracija napravljena tako da je korištena submerzno uzgojena tekuća kultura u kojoj su određene biomasa i željena komponenta te je iz toga izračunat faktor za izračunavanje biomase. Međutim obzirom na različitost uvjeta u submerznom uzgoju i u SSF, nije poznato u kojoj je mjeri ovakav faktor konverzije primjenjiv za SSF. Neki autori smatraju da je kalibraciju bolje provesti s membranskim kulturama (Mitchell i sur., 2002).

Proteine je jednostavno odrediti, ali se njihova analiza ne može koristiti za procjenu biomase ukoliko čvrsta podloga i sama sadrži znatne količine proteina. Pored toga, neke metode za određivanje fungalnih proteina mogu dati rezultate koji su manji ili veći od stvarnih. Stoga neki koriste spektroskopske metode koje detektiraju amidne veze u proteinima. Takve metode se mogu koristiti on-line, premda se one još trebaju unaprijediti zbog velike interferencije vode (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

Hitin, koji je netopljivi linearni polimer sastavljen od jedinica N-acetilglukozamina vezanih  $\alpha$ -1,4-vezom. Prisutan je u insektima i u staničnoj stijenci većine funga, a nema ga u ostalim mikroorganizmima kao ni u zelenim biljkama. Stoga predstavlja spoj koji je specifičan za funge i time vrlo koristan kod određivanja biomase u čvrstim supstratima koji su kolonizirani fungima. Međutim, pritom je problem što udjel hitina u stanicama funga u biomasi ovisi o starosti kulture, pa koncentracija glukozamina, koji nastaje razgradnjom hitina, nije izravno proporcionalna količini biomase tijekom cijelog uzgoja (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003). Također, analiza hitina daje procjenu ukupnog fungalnog materijala i ne omogućava razlikovanje između vrsta funga, kao ni između živih i mrtvih hifa (Mitchell i sur., 2002). Hidroliza biomase i naknadno određivanje glukozamina kemijskom metodom može biti vrlo dugotrajno, a određivanje glukozamina u hidrolizatu provodi se pomoću HPLC (Mitchell i sur., 2006; Ride i Drysdale, 1972; Matcham i sur., 1985).

Pokazalo se u praksi da je udio ergosterola u fungalnoj biomasi stabilniji nego udjeli hitina i proteina, pa je zato najbolje analizirati ergosterol (Mitchell i sur., 2006; Lacković, 2012; Matcham i sur., 1985). Obzirom da je ergosterol prevladavajući sterol u većini funga, on se koristi za procjenu fungalne biomase u mnogim tipovima SSF. Može se kvantificirati primjenom različitih analitičkih metoda poput tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (eng. high pressure liquid chromatography, HPLC), plinske kromatografije (eng. gas chromatography, GC) ili UV-spektrometrije (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

### 2.6.2. Mjerenje i kontrola procesnih parametara

Nekoliko ključnih procesnih parametara su aktivitet vode, pH-vrijednost, temperatura, koncentracije plinova te koncentracije supstrata i proizvoda unutar čestica. Ove varijable ne mogu se lako kontrolirati (Mitchell i sur., 2002).

#### 2.6.2.1. Mjerenje i kontrola prisutne vlage

Maseni udio vode je mnogo lakše mjeriti nego aktivitet vode. Najjednostavnija metoda određivanja udjela vode je sušenje u sušioniku, a uz nju se također koristi i sušenje u vakuumu, titracijska metoda po Karlu Fischeru, plinska kromatografija, infracrvena (eng. infrared, IR) analiza i nuklearna magnetska rezonancija (NMR) (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

Najčešće se suši pri 100 ili 105 °C u sušioniku tijekom 24 sata ili do konstantne mase, a pritom postoji više mogućih izvora pogreške (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003):

- Ukoliko osim vode ispare i drugi spojevi koji će doprinijeti gubitku mase, npr. ako mikroorganizam proizvodi hlapljive spojeve poput etanola ili organskih kiselina.
- Ako nastane kora na površini uzorka onda može spriječiti potpuno uklanjanje vode.
- Maillardovom reakcijom između amina i šećera nastaje voda što izaziva kasnije uklanjanje vode ili krive rezultate.
- Koristi se određeno vrijeme sušenja ali je moguće da se voda ne ukloni potpuno pa se preferira sušenje do konstantne mase, međutim to može dovesti do naprikladno dugog vremena analize. Vrijeme sušenja potrebno za potpuno uklanjanje vode ovisi o temperaturi sušenja, početnoj koncentraciji vode i prirodi uzorka.

Aktivitet vode može se odrediti pomoću električnog higrometra. Uzorci se uzimaju iz bioreaktora i smještaju u zatvoren prostor u kojem se nalazi senzor. Druga je mogućnost da senzor higrometra bude smješten u gornjem dijelu bioreaktora. Higrometri obično pokazuju točnu vrijednost s odstupanjem do 2 %, međutim različiti higrometri imaju različita mjerna područja. Kako bi bili točni i dali ponovljive rezultate, električni higrometri moraju biti kalibrirani, s tim da učestalost kalibracije ovisi o instrumentu i načinu njegovog korištenja. Senzori se najčešće kalibriraju iznad zasićenih otopina anorganskih soli (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

Razinu vlažnosti u SSF-procesima nije lako kontrolirati i većinom se samo nastoji smanjiti gubitke vlage tako da se aerira zrakom koji je zasićen ili gotovo zasićen vlagom. Međutim, čak i tada može doći do gubitka vlage tijekom uzgoja jer metabolička toplina zagrijava zrak pa tako ispari više vode. Osim toga, ponekad treba aerirati zrakom niske vlažnosti, kako bi isparavanjem došlo do hlađenja. To može dovesti do velikih gubitaka vode, što zahtijeva nadoknađivanje vlage u supstratu. U praksi se tijekom uzgoja voda može povremeno dodavati izravno u supstrat. Najučinkovitije je vodu dodavati u obliku fine maglice (Mitchell i sur., 200; Mitchell i Berović, 2003).

#### **2.6.2.2. Mjerenje i kontrola pH-vrijednosti**

Pri submerznom uzgoju, pH-vrijednost se može lako izmjeriti staklenim elektrodama. Da bi mjerenja bila točna, vrh elektrode mora biti potpuno uronjen u vodenu fazu, što u većini slučajeva kod čvrstih supstrata nije izvedivo i nije zadovoljavajući kontakt između supstrata i elektrode. Dostupne elektrode s plosnatim vrhom imaju mane poput sporog odgovora i nestabilnosti bazne linije, a čak ni s takvim elektrodama ne bi se mogao osigurati zadovoljavajući kontakt za on-line primjenu. U svakom slučaju staklene elektrode nisu dovoljno robustne, a u primjeni u SSF-procesima bi bile pod većim stresom nego pri submerznom uzgoju. Zato su on-line mjerenja pH-vrijednosti u SSF-procesima vrlo rijetka. Upotreba elektrode s plosnatim vrhom omogućuje off-line mjerenja, međutim za off-line mjerenja obično se ne koristi čvrsti supstrat već njegove vodene suspenzije ili ekstrakti čvrstog supstrata. On-line mjerenja pH-vrijednosti u SSF-procesima su zbog brojnih prepreka i poteškoća vrlo rijetka (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

Kontrola pH-vrijednosti u SSF je teška, ne samo zbog nedostatka odgovarajućih on-line pH-senzora, nego i zbog heterogenosti sustava. Tako će pH-vrijednost varirati unutar čestica supstrata i između različitih čestica. Isto tako, teško je podjednako rasporediti otopine za korekciju pH-vrijednosti, stoga ih je poželjno dodavati u obliku finog spreja ili maglice. Neizravna metoda kontrole pH-vrijednosti je manipuliranje izvorom dušika (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

#### **2.6.2.3. Mjerenje i kontrola temperature**

Temperatura je parametar koji se relativno jednostavno mjeri pri submerznom uzgoju. Međutim, niska vlažnost u SSF-procesu uzrokuje limitaciju prijenosa topline, pa je odvođenje topline problem. U praksi se ponekad temperatura niti ne mjeri već se kultura smjesti u okoliš

konstantne temperature, što je učinkovito za procese provedene u laboratorijskom mjerilu, dok nije prikladno za mjerilo veće od nekoliko stotina grama. Najbolja metoda mjerenja i kontrole temperature je pomoću termoelemenata umetnutih u supstrat. Time se mjeri temperatura te se povratnom spregom kontroliraju brzina protoka, temperatura i vlažnost zraka za aeraciju. Budući da je evaporacijsko hlađenje najefikasniji način uklanjanja topline u SSF, najefikasnije je smanjiti vlažnost zraka. Međutim obzirom da se time isušuje supstrat potrebno je potom nadoknaditi vlagu (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

#### **2.6.2.4. Kontrola sastava plinova**

Za određivanje koncentracije kisika u plinskoj fazi koriste se dvije metode: plinska kromatografija i paramagnetska analiza. Prednost paramagnetske analize je mogućnost kontinuiranog on-line mjerenja i integriranje u sustav kontrole ulaznog toka zraka.

Ugljikov dioksid također se određuje dvjema metodama: plinska kromatografija i infracrvena analiza. Infracrvena analiza se može kontinuirano provoditi on-line (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

#### **2.6.2.5. Praćenje koncentracija supstrata i produkata**

Određivanje koncentracija supstrata i proizvoda kod SSF-procesa nije nimalo teže nego kod submerznih procesa, pod uvjetom da se određivani spoj može ekstrahirati u vodi ili drugom odgovarajućem otapalu. Međutim, s obzirom na heterogenost između raznih dijelova supstrata unutar SSF-sustava, mogući su problemi s dobivanjem reprezentativnog uzorka te je potrebno primijeniti prikladan režim uzorkovanja. Također mogu postojati gradijenti unutar čestica supstrata, a ekstrakcija tih spojeva iz čestice dat će samo prosječnu vrijednost. Još uvijek ne postoje metode za on-line procjenu koncentracije supstrata ili proizvoda unutar čestica (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003). Mogućnost kontrole koncentracije supstrata i proizvoda tijekom SSF-procesa vrlo je ograničena, iako se tijekom pripreme supstrata može donekle utjecati na rast odabirom nutrijenata i njihovih koncentracija pogodnih za rast ili za proizvodnju određenog spoja (Mitchell i sur., 2002).



## 2.7. Bioreaktori za uzgoj na čvrstim supstratima

Bioreaktori koji se koriste u SSF-procesima moraju imati različite mogućnosti (Mitchell i sur., 2002):

- Sterilizacija i sprečavanje kontaminacije;
- Odvođenje topline kako bi se spriječilo pregrijavanje sadržaja;
- Miješanje podloge radi održavanja homogenosti i olakšanog prijenosa topline i mase;
- Aeracija radi dovoljne opskrbe kisikom i sprječavanja nakupljanja ugljičnog dioksida;
- Mjerenje i kontrolu ključnih parametara procesa;
- Rukovanje čvrstim materijalom tijekom punjenja, inokulacije, uzorkovanja i pražnjenja.

Sterilizacija je jedan od ključnih faktora za uspješnost SSF-procesa. Ona je preduvjet za uzgoj monokultura i definiranih mješovitih kultura. Sterilizacija čvrstog supstrata može se izvršiti izravnim injektiranjem pare u sloj supstrata, ili to može biti neizravno, uvođenjem pare u plašt. Može se obaviti i izvan bioreaktora, u zasebnom sterilizatoru, iako se u tom slučaju treba posebno paziti na sterilni prijenos u bioreaktor (Mitchell i sur., 2002).

Odvođenje topline predstavlja glavni kriterij dizajniranja SSF-bioreaktora, kako statičkih tako i onih s miješanjem. Niski sadržaji vlage u čvrstim supstratima vode do niskih brzina prijenosa topline, koje su često nedovoljne za uklanjanje topline oslobođene mikrobnim metabolizmom. Mehanizmi prijenosa topline unutar SSF-bioreaktora su kondukcija, konvekcija i isparavanje, a relativni doprinos pojedinog mehanizma hlađenju bioreaktora ovisi o načinu rada bioreaktora. U statičkim sustavima bez prisilne aeracije prijenos topline unutar podloge uglavnom će biti ograničen na kondukciju. Prisilna aeracija omogućuje konvektivno hlađenje unutar mase supstrata, a kako se zrak zagrijava tako uzrokuje i evaporacijsko hlađenje. Zbog velike topline isparavanja vode, hlađenje isparavanjem je najučinkovitiji mehanizam za odvođenja topline u SSF-procesima. Međutim, isparavanjem se smanjuje udio vode u sustavu u kojem je već ograničena dostupnost vode. Unutrašnji i vanjski izmjenjivači topline se ugrađuju u mnoge bioreaktore, uključujući one s nasutim slojem i bioreaktore s miješanjem tijekom uzgoja (Mitchell i sur., 2002).

Miješanjem se održava homogenost u bioreaktoru te potiču prijenos topline i prijenos tvari. Miješanje pomaže u dovodjenju čvrste hranjive podloge u kontakt s površinama preko kojih se odvija prijenos topline, a također pomaže dovodjenje plinske faze u međučestične prostore. Osim toga, u nekim postupcima mogu se javiti gradijenti udjela vode u supstratu pa će miješanje spriječiti lokalizirano sušenje ili prekomjerno vlaženje. Način miješanja ne smije dovesti do pretjeranog oštećenja mikroorganizma ili čestica supstrata. Međutim, vrlo malo pozornosti se pridaje jačini smičnih sila i njihovim učincima na rast mikroorganizama u SSF-procesima. Zbog mogućeg štetnog učinka miješanja, ponekad se ono provodi samo povremeno. Potrebna učestalost miješanja ovisit će o brzinama nakupljanja topline i potrošnje kisika (Mitchell i sur., 2002).

Većina SSF-procesa je aerobnog tipa. Plinska faza je u bliskom kontaktu s čvrstim česticama i prisutna je velika površina za prijenos kisika u tekući film na čvrstoj površini. Stoga je ključni cilj u SSF-procesu održavati visoku razinu kisika te nisku razinu ugljikovog dioksida u međučestičnim prostorima. Točan mehanizam ulaska kisika u mikroorganizam u SSF-procesu je slabo istražen, ali je poznato da unos kisika iz međučestičnih prostora uključuje četiri koraka:

- prijenos kisika iz raspršenog kisika u međučestičnim prostorima preko mirujućeg sloja plina na površini čestice;
- prijenos kisika preko granične površine između mirujućeg sloja plina i tekućeg filma na površini supstrata;
- ulaz kisika u mikroorganizam, izravno iz mirujućeg sloja plina ili iz tekućeg filma na površini supstrata, ovisno o smještaju micelija;
- difuzija kisika kroz tekuću fazu podloge u unutrašnjost čestice.

Micelijski sloj na površini supstrata troši kisik, pa se koncentracija kisika obično naglo smanjuje s dubinom. Tijekom aktivnog rasta može doći do potpunog iscrpljenja kisika na dubini od samo 100 mikrometara (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003).

### 2.7.1. Tipovi bioreaktora za uzgoj na čvrstim supstratima

SSF-bioreaktore je korisno kategorizirati na temelju načina aeracije i miješanja. Na taj način su zajedno svrstani bioreaktori koji mogu izgledati prilično različito, ali rade na sličan način.

Moguća su dva načina aeracije (Mitchell i sur., 2002):

- kruženje zraka oko sloja supstrata;
- prisilno propuhivanje zraka kroz sloj supstrata.

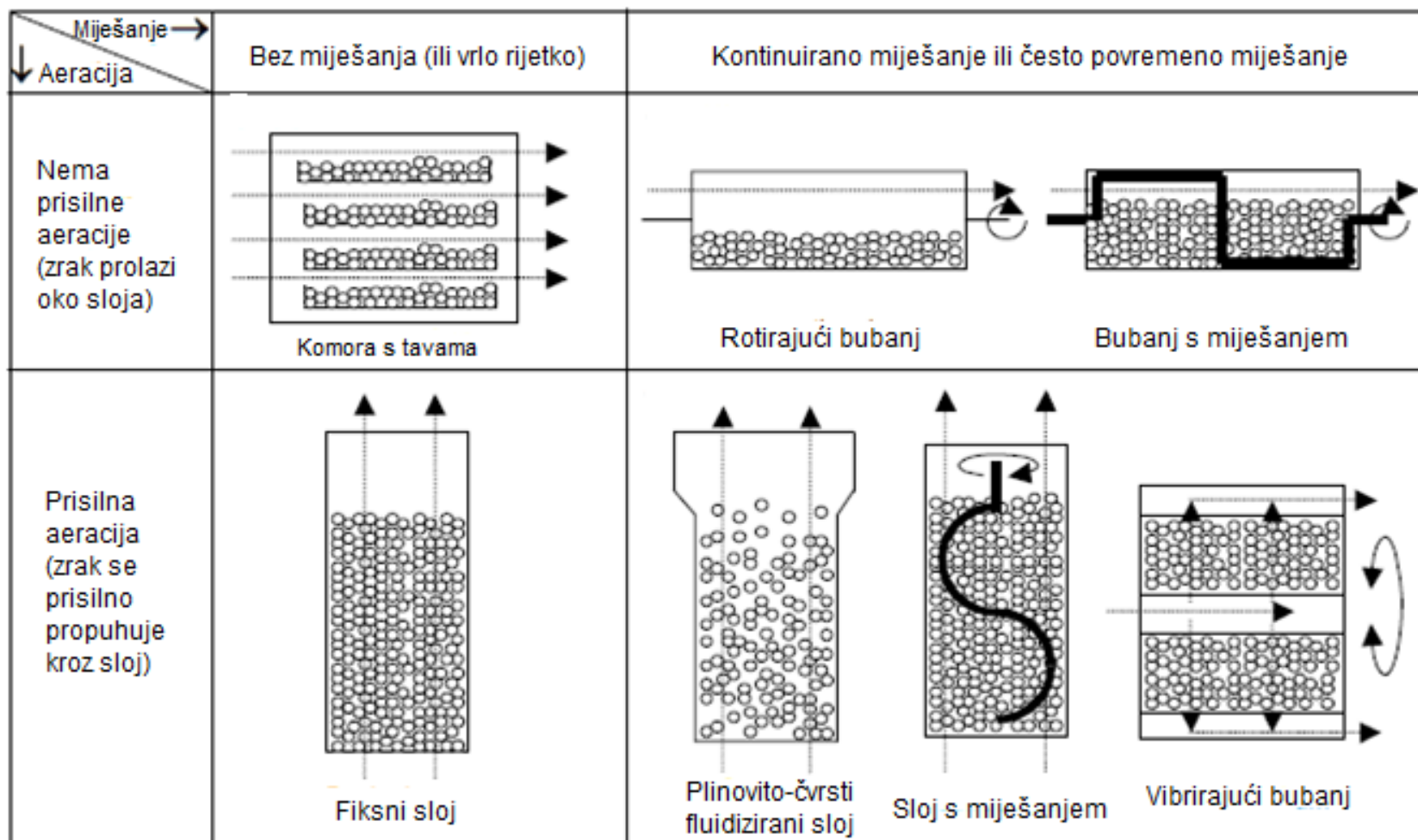
S obzirom na miješanje, postoje ove mogućnosti (Mitchell i sur., 2002):

- čvrsti sloj može mirovati;
- čvrsti sloj se može miješati svakih nekoliko sati ili jednom dnevno;
- čvrsti sloj se miješa kontinuirano ili relativno često, tj. više puta na sat.

Ovakvom podjelom bioreaktori su razvrstani u 4 grupe, kao što je prikazano u Tablici 3 i na Slici 13.

**Tablica 3.** Klasifikacija SSF-bioreaktora prema načinima aeracije i miješanja  
(Mitchell i sur., 2002).

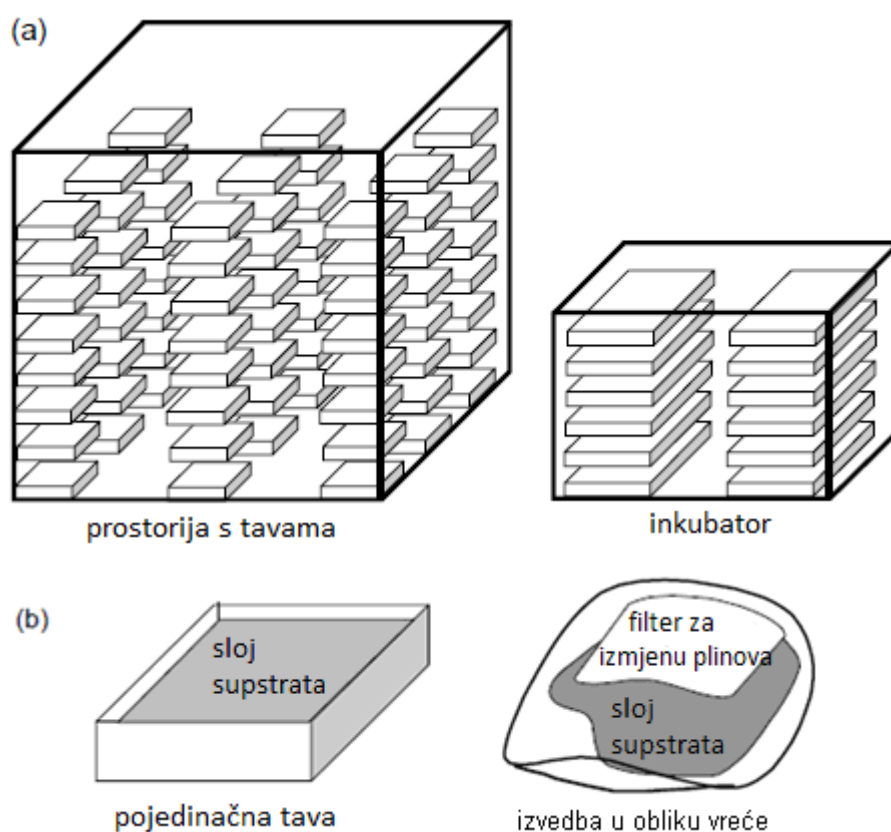
Način aeracije	Način miješanja	
	Bez miješanja ili vrlo rijetko miješanje	Kontinuirano miješanje ili često povremeno miješanje
Nema prisilne aeracije (zrak prolazi oko sloja)	Grupa 1 ▪ Bioreaktori s tavama	Grupa 3 ▪ Bioreaktori s rotirajućim bubnjem ▪ Bioreaktori s bubnjem i miješanjem
Prisilna aeracija (zrak se prisilno propuhuje kroz sloj)	Grupa 2 ▪ Bioreaktori s fiksnim slojem ▪ Povremeno miješani bioreaktori s fiksnim slojem	Grupa 4 ▪ Bioreaktori s fiksnim slojem i miješanjem ▪ Bioreaktori s vibrirajućim bubnjem ▪ Bioreaktori s fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem



**Slika 13.** Osnovne karakteristike dizajna raznih SSF-bioreaktora, svrstanih u 4 grupe prema načinima aeracije i miješanja (Mitchell i sur., 2006).

### 2.7.1.1. Bioreaktori s tavama (eng. tray bioreactors)

Bioreaktori s tavama se sastoje od prostorija ili ormara koji sadrže više pojedinačnih tava (Slika 14). Vlaga i temperatura zraka u prostoriji obično se kontrolira, a cirkulacija zraka u prostoriji i uvođenje svježeg zraka može se poticati puhalima. Učinkovitost cirkulacije ovisit će o nekoliko čimbenika kao što su veličina i geometrija prostorije, smještaj ulaznih otvora, izlaznih otvora i puhala, smještaj tava i razmaci između njih (Mitchell i sur., 2002).



**Slika 14.** Osnovne značajke i moguće varijacije dizajna bioreaktora s tavama (Mitchell i sur., 2006).

- (a) Različite komore s tavama, uključujući prostorije i inkubatore, u kojima su tave posložene na policama.
- (b) Različiti osnovni dizajni tava. Tava s lijeve strane može biti izrađena od drveta, plastike, bambusa ili žice. Plastična vrećica zdesna može cijela biti izrađena od plastike propusne za zrak, ili sadržavati filter za izmjenu plinova.

Pojedinačne tave mogu biti izrađene od bambusa, drveta, plastike ili žičane mreže. Obično su takve tave otvorene s gornje strane, a bočne strane i dno mogu biti perforirani kako bi se potaknula razmjena plinova. Uzgoj u mikroporoznim plastičnim vrećicama može se smatrati uzgojem u tavama i nudi mogućnost razmjene plinova između tave i praznog prostora reaktora, uz sprečavanje kontaminacije. To može biti važno jer zrak u gornjem slobodnom prostoru ovakvih bioreaktora obično nije sterilan. Sadržaji tava mogu mirovati tijekom cijelog uzgoja ili ih se može ručno okretati jednom ili dva puta dnevno (Mitchell i sur., 2002).

S obzirom na činjenicu da zrak samo cirkulira oko površina tavi i ne propuhuje se prisilno kroz sloj supstrata, prijenos mase u tavama je ograničen na difuziju, a prijenos topline na kondukciju. Zbog toga se mogu pojaviti značajni gradijenti temperature (oko  $3\text{ }^{\circ}\text{C cm}^{-1}$ ) i udjela plinovite faze (oko 1,7 % (v / v)). Mogući doprinos prirodne konvekcije uzrokovane ovim toplinskim gradijentima na prijenos topline i mase nije istražen. Na površini tave toplina se može izgubiti konvekcijom i isparavanjem u okolni zrak. Međutim, korištenje suhog zraka za poticanje isparavanja komplicirano je zbog potrebe nadomještanja vode, budući da se površina supstrata brzo isušuje, pa se zato obično koristi zrak visoke vlažnosti. Učinkovitost konvekcije ovisi o brzini kojom zrak u gornjem slobodnom prostoru bioreaktora cirkulira preko površine supstrata i temperaturnoj razlici između površina tava i zraka (Mitchell i sur., 2002).

Ograničenja primjene tava dokazana su eksperimentalno i modeliranjem. U nedostatku prisilne aeracije, jedine radne varijable kojima se može manipulirati su temperatura, vlažnost zraka i brzina protoka zraka u gornjem slobodnom dijelu, a glavna varijabla dizajna je dubina sloja supstrata u tavi. Što je visina sloja veća to je vjerojatnije da će se u sredini sloja dostići nepoželjno visoke temperature, te da će u pojedinim dijelovima sloja ponestati kisika tijekom uzgoja. Maksimalna visina sloja kod koje takva ograničenja još ne postaju nepoželjno visoka obično je 2 - 10 cm, a ovisi o brzini rasta organizma. S obzirom na ovo ograničenje, procesi mogu biti preneseni u veće mjerilo povećanjem broja i širine tava, ali ne i visine sloja. Stoga procesi u velikom mjerilu zahtijevaju intenzivan rad zbog potrebe ručnog punjenja, sterilizacije, miješanja i pražnjenja velikog broja tava (Mitchell i sur., 2002).

S druge strane, sustavi tava su prilično jednostavni za uporabu i zahtijevaju relativno mala ulaganja, i mnogi komercijalni procesi malih i srednjih razmjera provode se u različitim dijelovima svijeta, posebno u Aziji. Umak od soje *koji* i *tempe* tradicionalno su pripremani na

ovaj način već stoljećima, i mnoge male tvrtke još uvijek koriste tehnologiju tava (Mitchell i sur., 2002).

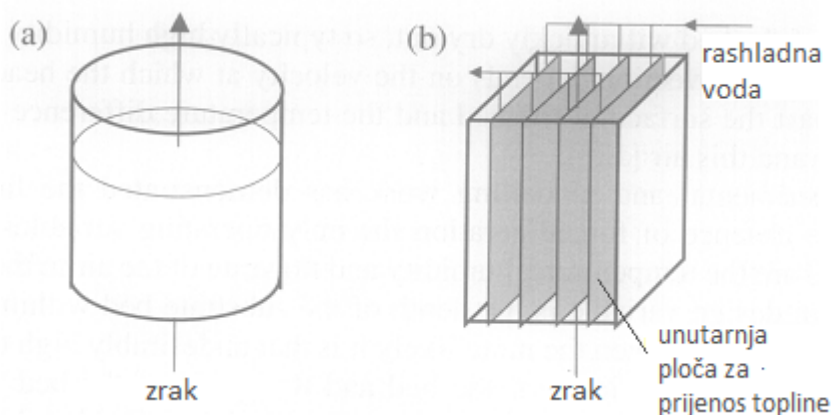
S obzirom na ograničenja sustava tava, čini se da postoji malo prostora za optimiranje njihovih izvedbi. Međutim, Mitchell i sur. (2002) citiraju model prijenosa topline i kisika u sloju supstrata u tavi koji omogućuje istraživanje optimalne kombinacije visine sloja i temperature zraka iz gornjeg slobodnog prostora bioreaktora. Za rast plijesni *Aspergillus niger*, koja relativno brzo raste, model je predvidio da bi se prinosi blizu maksimalnih mogli dobiti samo pri dubini sloja od 3 cm ili manje, pri čemu je temperatura zraka blizu optimuma za rast. Niže temperature zraka usporile su rast u najudaljenijim dijelovima sloja, dok je viši sloj doveo do visokih temperatura unutar sloja. Ovaj model je proširen istraživanjem bilance vode, međutim, njime je predviđeno da je difuzija vode unutar sloja zanemariva ako se održava visok stupanj vlažnosti okolnog zraka radi smanjivanja isparavanja (Mitchell i sur., 2002).

### **2.7.1.2. Statični bioreaktori s fiksnim slojem i bioreaktori s fiksnim slojem i povremenim miješanjem**

Statični (ili stacionarni) bioreaktori s fiksnim slojem (eng. static packed-bed bioreactors) i bioreaktori s fiksnim slojem i povremenim miješanjem (eng. intermittently stirred packed-bed bioreactors) su zasebna skupina SSF-bioreaktora. Tipičan dizajn fiksnog sloja je stupac ispunjen supstratom, kroz koji se zrak propuhuje s jednog kraja na drugi. Stupac može biti horizontalan ili vertikalni. Kod vertikalnog, supstrat miruje na perforiranoj baznoj ploči, a zrak se može puhati s vrha ili s dna reaktora. Moguće su i druge varijacije aeracijskog sustava, kao što je uvođenje zraka kroz perforiranu cijev koja prolazi uzduž središnje osi stupca. Moguća su dva osnovna dizajna fiksnog sloja (Slika 15). Kod tradicionalnog fiksnog sloja bioreaktor može imati vodeni plašt, ali nema dodatnih unutarnjih površina za prijenos topline. Kod *Zymotis* tipa fiksnog sloja, unutarnje ploče za prijenos topline su umetnute u sloj, paralelno sa strujom zraka (Slika 15b) (Mitchell i sur., 2002).

Sloj supstrata je obično stacionaran. No, čak i ako se sloj rijetko miješa, npr. svakih nekoliko sati, rad bioreaktora će biti sličan onom u fiksnom sloju kroz većinu vremena

uzgoja. Takav rad je primjenjiv samo u tradicionalnoj izvedbi bioreaktora s fiksnim slojem, jer će unutarnje ploče u *Zymotis* tipu reaktora spriječiti miješanje krutog sadržaja.



**Slika 15 .** Usporedba osnovnih karakteristika tradicionalnog bioreaktora s fiksnim slojem (a) i *Zymotis* bioreaktora s fiksnim slojem (b) (Mitchell i sur., 2002).

Kod tradicionalnih bioreaktora s fiksnim slojem, koji se koriste u velikom mjerilu i čiji je promjer nekoliko metara, odvođenje topline kroz bočnu stijenku odvija se samo u nekoliko centimetara debelom sloju koji je najbliže stijenci. Konvekcijsko odvođenje topline iz krutina prolaskom zraka kroz sloj dovodi do značajnih aksijalnih temperaturnih gradijenata. Eksperimentalno su promatrani gradijenti veličine  $1\text{ }^{\circ}\text{C cm}^{-1}$ . Ovi temperaturni gradijenti povećavaju kapacitet zasićenja zraka vodenom parom i stoga je nemoguće spriječiti isparavanje unutar tradicionalnog bioreaktora s fiksnim slojem, čak i ako je ulazni zrak zasićen vlagom. To isparavanje doprinosi uklanjanju topline, ali također i zahtijeva dodavanje vode kako bi se izbjeglo isušivanje supstrata koje limitira rast. Nadopunjavanje vode je izvedivo samo ako se sloj miješa tijekom dodavanja vode, jer je u protivnom gotovo nemoguće postići jednoliku raspodjelu dodane vode (Mitchell i sur., 2002).

Kod tradicionalnih fiksnih slojeva vrlo malih promjera i u *Zymotis* tipu fiksnog sloja, uklanjanje topline kroz bočnu stijenku može smanjiti aksijalne temperaturne gradijente, te na taj način smanjiti isparavanje i potrebu za dodavanjem vode. Stoga *Zymotis* fiksni sloj ima prednost u odnosu na tradicionalne fiksne slojeve u procesima u kojima sloj supstrata treba ostati potpuno statičan (Mitchell i sur., 2002; Mitchell i Berović, 2003). Razmatranje potrošnje kisika obično nije kritično za bioreaktore s fiksnim slojem, jer ako brzina aeracije zadovoljava potrebu za hlađenjem, onda će potreba za aeracijom biti više nego zadovoljena, ukoliko izlazne koncentracije kisika ne padnu znatno ispod 20 % (v/v).



Još jedan važan fenomen u bioreaktorima s fiksnim slojem je pad tlaka uzduž kolone. Kako fungi rastu na površini supstrata i protežu se u međučestične prazne prostore, tako se povećava otpor sloja prema protoku zraka. Osim što ovo povećava energetske potrebe za aeraciju, isto tako povećava vjerojatnost nastajanja kanala (eng. channelling), uslijed pojavljivanja pukotina u samom sloju ili između sloja i stijenke bioreaktora. Zato zrak teče pretežno kroz te pukotine, ostavljajući većinu sloja neaeriranim. U laboratorijskim ispitivanjima, padovi tlaka na početku uzgoja obično su zanemarivi, ali mogu se povećati do vrijednosti visine 2,75 cm H<sub>2</sub>O po centimetru sloja pri uobičajenim uvjetima rada. Pretjerani padovi tlaka obično se mogu spriječiti miješanjem sloja. Štoviše, u slučajevima kad se primjenjuje rijetko miješanje obično je cilj tog miješanja upravo smanjiti pad tlaka kroz sloj, a ne pomoći u uklanjanju topline (Mitchell i sur., 2002).

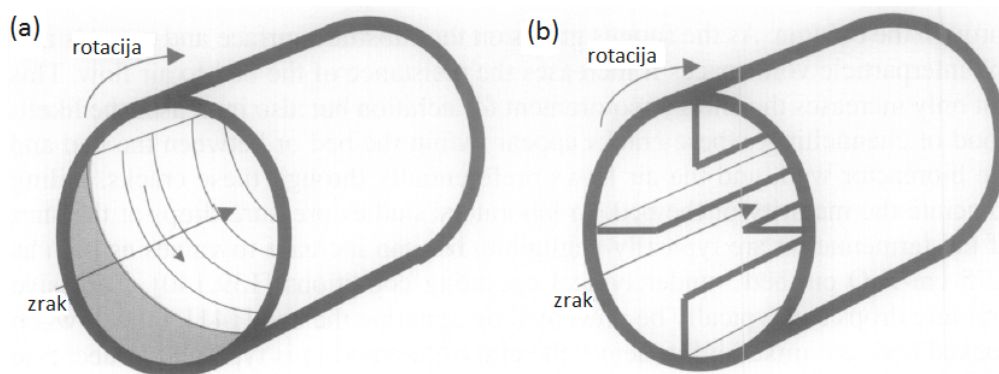
Varijable dizajna bioreaktora s fiksnim slojem su (Mitchell i sur., 2002):

- visina i širina bioreaktora,
- prisutnost ili odsutnost vanjskog vodenog plašta,
- prisutnost ili odsutnost unutarnjih ploča za prijenos topline
- prisutnost ili odsutnost sustava za povremeno miješanje.

Razmak između susjednih ploča je uveden kao dodatna varijabla dizajna kod bioreaktora s ugrađenim unutarnjim pločama za prijenos topline.

Operativne varijable su temperatura, vlažnost i brzina protoka ulaznog zraka, temperatura i brzina protoka rashladne vode, a u slučaju povremenog miješanja treba razmotriti i učestalost, trajanje i intenzitet miješanja te hoće li se supstratu dodati voda za vrijeme miješanja ili se neće dodati. Matematički modeli su se pokazali korisnima pri istraživanju optimalne kombinacije dizajna i radnih uvjeta za bioreaktore s fiksnim slojem. Rezultati tih istraživanja pokazuju da je površinska brzina zraka vjerojatno najvažnija operativna varijabla za tradicionalne fiksne slojeve (bez unutrašnjih ploča) u velikom mjerilu, dok je visina sloja ključna varijabla dizajna. U slučaju *Zymotis* fiksnog sloja su između ploča potrebni razmaci 5 - 10 cm, kako bi se optimirao rad bioreaktora. U ovom tipu bioreaktora treba primijeniti sustav kontrole kojim se temperatura vode u pločama za hlađenje smanjuje s povećanjem temperature sloja na mjestu izlaza zraka (Mitchell i sur., 2002).

### 2.7.1.3. Bioreaktori s rotirajućim bubnjem i bioreaktori s bubnjem i miješanjem

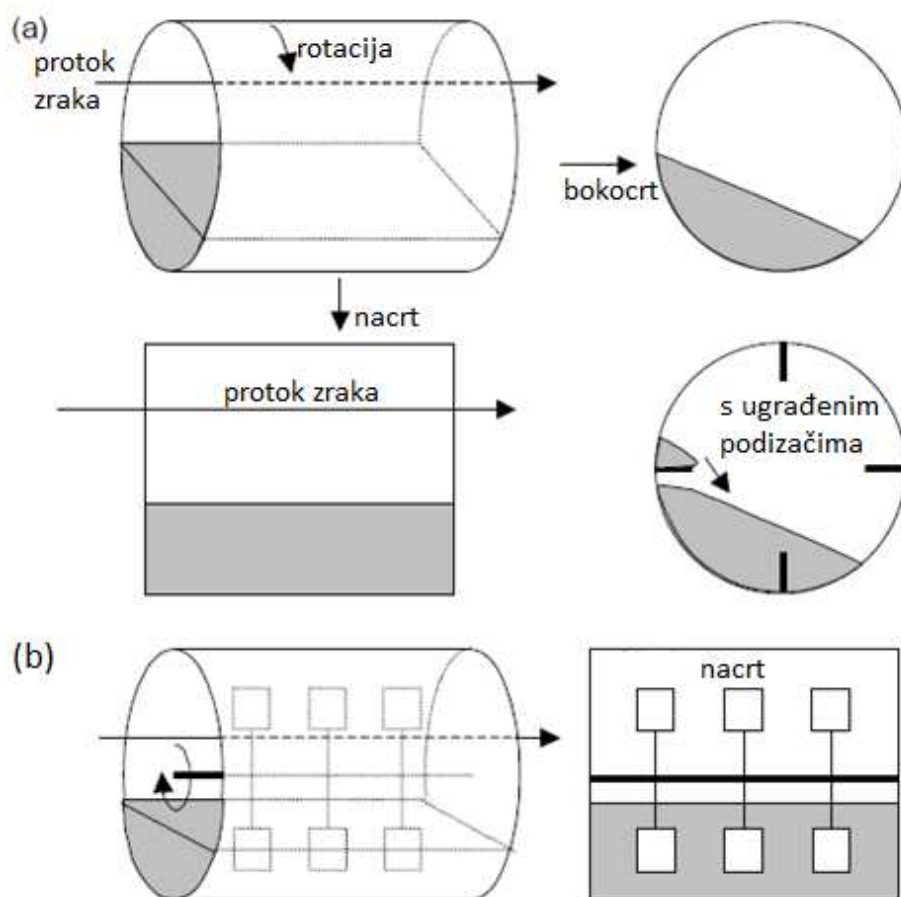


**Slika 16.** Shema bioreaktora s rotirajućim bubnjem (Mitchell i sur., 2002):

- a) bez podizača
- b) s podizačima.

Bioreaktor s rotirajućim bubnjem (eng. rotating drum bioreactors) i bioreaktor s bubnjem i miješanjem (eng. stirred drum bioreactors) (Slika 17) imaju miješani sloj supstrata unutar vodoravnog ili blago nagnutog cilindra i uvođenje zraka u prostor iznad sloja (Mitchell i sur., 2002). Obično sloj supstrata zauzima od 10 do 40 % volumena bubnja. Razlika između ove dvije vrste reaktora je u načinu miješanja sloja. U rotirajućem bubnju miješanje se provodi samo okretanjem bubnja, a može se potaknuti ugradnjom unutrašnjih pregrada (eng. baffles) koje se ispravnije mogu zvati podizači (eng. lifters) (Slike 16 i 17). Miješanje sloja kod bioreaktora s bubnjem i miješanjem se postiže lopaticama (eng. paddles) ili strugačima (eng. scrapers) postavljenim na središnju osovinu. Obično je miješanje kontinuirano iako može biti i diskontinuirano (Mitchell i sur., 2002).

Postoje i varijacije bubnjeva s miješanjem i rotirajućih bubnjeva u kojima se koriste horizontalni cilindri, ali se zrak uvodi kroz otvore smještene unutar samog sloja. Unatoč vanjskoj sličnosti, takvi se reaktori svrstavaju u reaktore s miješanim slojem jer prisilna aeracija uzrokuje različitu dinamiku rada nego kad se zrak uvodi u gornji prostor reaktora (Mitchell i sur., 2002).



**Slika 17.** Osnovne značajke bioreaktora s rotirajućim bubnjem te bioreaktora s bubnjem i miješanjem (Mitchell i sur., 2006):

- a) bioreaktor s rotirajućim bubnjem,
- b) bioreaktor s bubnjem i miješanjem.

U velikom mjerilu se uklanjanje topline iz sloja odvija uglavnom konvekcijom i evaporacijom u zrak koji se nalazi u gornjem slobodnom prostoru. Učinkovitost prijenosa između sloja supstrata i slobodnog prostora će ovisiti o načinu kretanja krutina unutar sloja kao i o načinu kretanja zraka unutar slobodnog prostora. Način toka supstrata unutar sloja ovisi o prisutnosti ili odsutnosti podizača i brzini rotacije bubnja (Mitchell i sur., 2002).

U bioreaktorima s rotirajućim bubnjem, najčešće se koriste male brzine rotacije (oko 1 rpm). Kod rotirajućih bubnjeva bez podizača pri takvim brzinama rotacije krutine će obično slijediti režim padanja. Pritom se sloj krutine kreće kao cjelina, pomičući se prema gore sa stijenkom rotirajućeg bubnja, te pada natrag na dno bubnja. U tom slučaju, malo je pomaka unutar samog sloja i mogu se očekivati ponešto bolje performanse nego kod bioreaktora s

tavama. Ovaj problem se može izbjeći ugradnjom podizača, koji poboljšavaju miješanje unutar sloja i kontakt između sloja i slobodnog gornjeg prostora (Mitchell i sur., 2002).

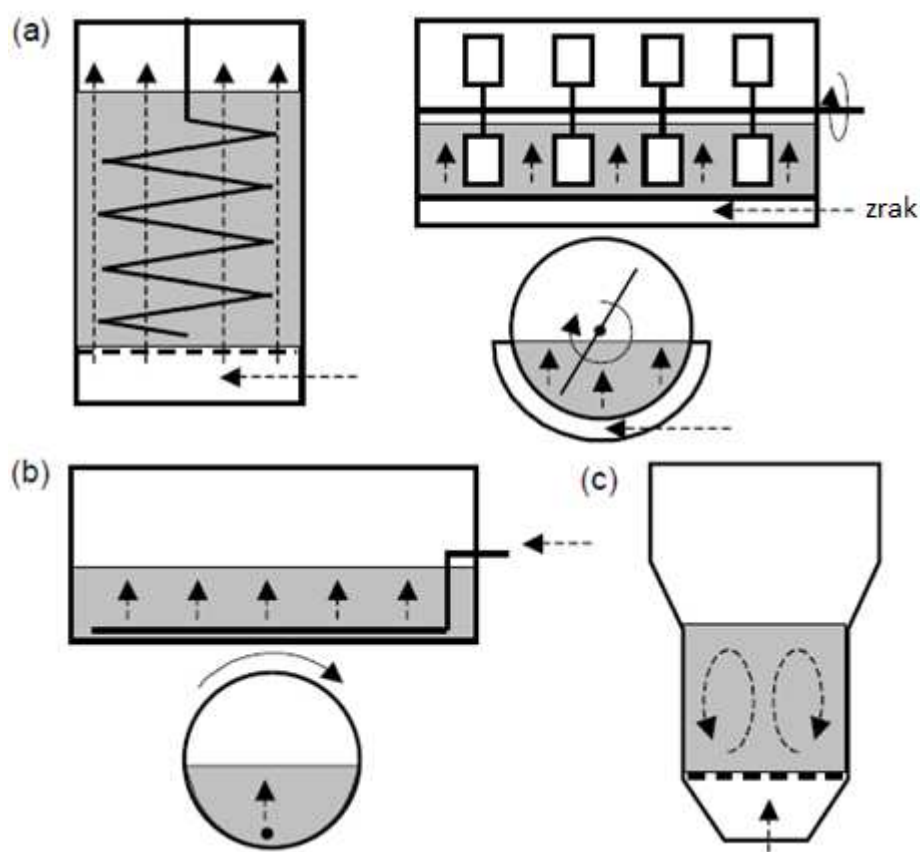
Obrasci strujanja u gornjem slobodnom prostoru ovise o dizajnu ulaznog i izlaznog otvora za zrak, o brzini protoka zraka i brzini rotacije bubnja. Odvođenje topline iz čvrstog sloja može se unaprijediti uporabom nezasićenog zraka da bi se potaknulo isparavanje. Vodu izgubljenu isparavanjem relativno je jednostavno nadomjestiti prskanjem fine maglice na površinu sloja, jer će miješanje osigurati njenu prilično ujednačenu raspodjelu (Mitchell i sur., 2002).

Matematički model prijenosa topline i mase unutar bioreaktora s rotirajućim bubnjem u laboratorijskom mjerilu sugerira da se topline iz sloja supstrata može odvoditi u okolinu uglavnom kroz stijenke bioreaktora. Međutim, u velikom mjerilu samo isparavanje može pružiti potrebnu brzinu uklanjanja topline. Ovaj model također sugerira da je prijenos topline iz sloja supstrata na stijenku bioreaktora učinkovitiji od prijenosa topline iz sloja supstrata u gornji slobodni prostor, što znači da će stijenka bioreaktora biti toplija od gornjeg prostora, te se stoga topline iz stijenke bioreaktora prenosi ne samo u okolinu nego i na plinove koji se nalaze u gornjem prostoru (Mitchell i sur., 2002).

Varijable dizajna za rotirajuće bubnjeve i bubnjeve s miješanjem su omjer duljine i promjera, prisutnost ili odsutnost podizača kod rotirajućeg bubnja te dizajn lopatica ili strugača u slučaju miješanog bubnja. Važne operative varijable su vlažnost zraka, temperatura zraka, brzina protoka zraka, koeficijent punjenja čvrstog materijala te brzina bubnja ili miješala. Međutim, koeficijent punjenja čvrstog materijala je obično već podešen na početku uzgoja pa se ne kontrolira tijekom procesa, a volumen sloja se pritom smanjuje kako mikroorganizam troši supstrat. Veće brzine miješanja vjerojatno poboljšavaju prijenos topline i tvari između sloja i gornjeg slobodnog prostora, ali isto tako povećavaju i efekte smicanja. To je vidljivo na primjeru u kojem je broj okretaja rotirajućeg bubnja s 10 okretaja u minuti (eng. rotations per minute, rpm) povećan na 50 okretaja u minuti, pri čemu je konačni prinos biomase smanjen za polovinu (Mitchell i sur., 2002).

### 2.7.1.4. Bioreaktori s miješanim slojem, vibrirajućim bubnjem i fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem

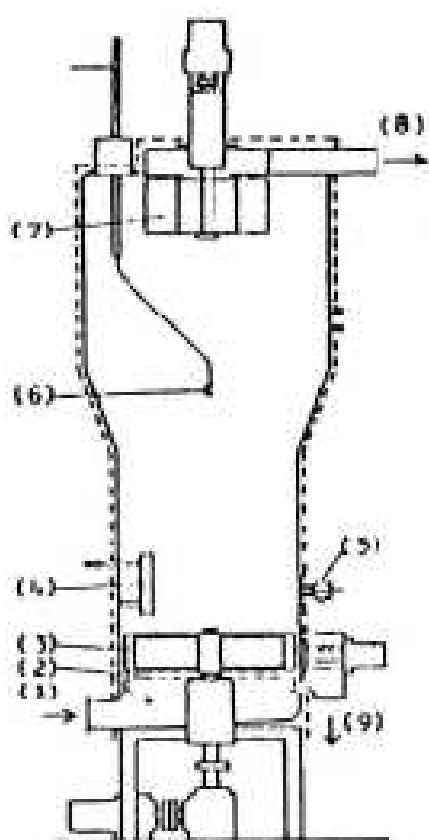
Zajedničke karakteristike bioreaktora s miješanim slojem (eng. stirred bed bioreactors), vibrirajućim bubnjem (eng. rocking drum bioreactors) i fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem (eng. gas-solid fluidized bed bioreactors) su prisilna aeracija sloja te kontinuirano ili često povremeno miješanje (Mitchell i sur., 2002). Miješanje se kod različitih izvedbi postiže na vrlo različite načine, a Slika 18 uspoređuje osnovne značajke mogućih izvedbi (Mitchell i sur., 2006).



**Slika 18.** Različiti načini miješanja kod kontinuirano miješanih, prisilno aeriranih bioreaktora (Mitchell i sur., 2006).

- (a) Mehaničko miješanje unutarnjim miješalom, npr. sloj s okomitim miješalom (lijevo) ili bubanj s prisilnom aeracijom i središnjim miješalom (desno).
- (b) Miješanje se postiže pomicanjem samog bubnja.
- (c) Miješanje se postiže strujanjem zraka.

Kod bioreaktora s miješanim slojem, kao potpora za supstrat služi perforirana ploča kroz koju se odozdo aerira, a sloj se miješa pomoću mehaničkog miješala (Slika 18a). Bioreaktori koji imaju fluidizirani sloj plinovito-čvrsto rade slično, ali je brzina aeracije dovoljno visoka da fluidizira čestice supstrata i dovodi do miješanja (Slika 18c). Moguće je ugraditi dodatno mješalo da bi se razbile nakupine koje se mogu inače istaložiti na dnu (Slika 19). U slučaju vibrirajućeg bubnja (Slika 18b), supstrat se nalazi između dva koncentrična perforirana horizontalna cilindra, a zrak se uvodi u središnji cilindar i prolazi radijalno kroz sloj prema van. Miješanje se postiže rotacijom drugog cilindra u odnosu na prvi (Mitchell i sur., 2002).



- 1 ulaz zraka,
- 2 distributor,
- 3 mješalo,
- 4 elektroda,
- 5 ejektor,
- 6 mlaznica raspršivača,
- 7 separator,
- 8 izlaz zraka,
- 9 izlaz proizvoda.

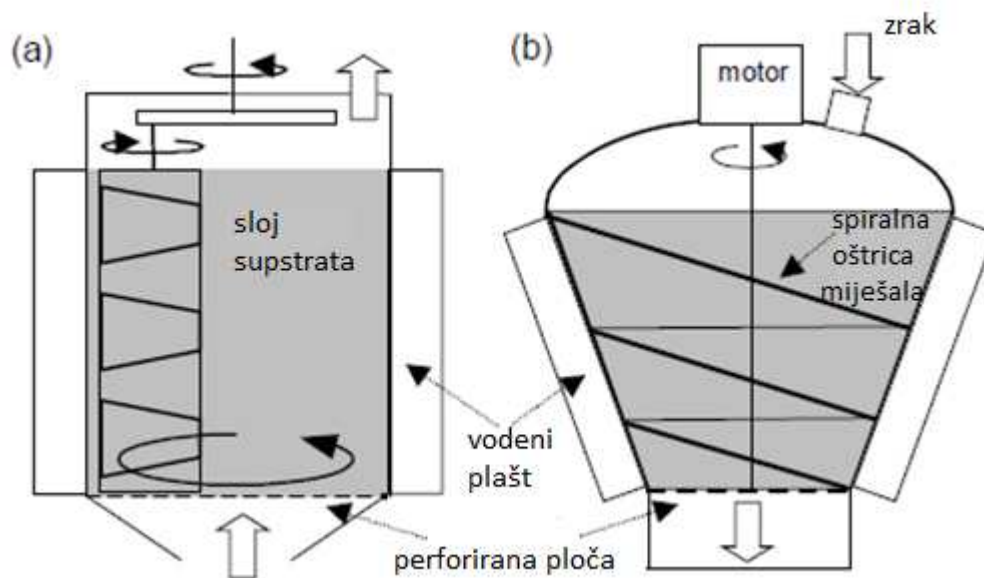
**Slika 19.** Shematski prikaz kontinuiranog bioreaktora s fluidiziranim plinovito-čvrstim slojem (Mitchell i Berović., 2003).

U sva tri slučaja, glavni mehanizam odvođenja topline je konvekcijsko i evaporacijsko hlađenje zrakom koji prolazi kroz sloj. Nezasićeni zrak se može koristiti za poticanje isparavanja s obzirom da miješanje omogućuje ravnomjernu raspodjelu dodane vode. Kod bioreaktora s miješanim slojem i fluidiziranim slojem plinovito-čvrsto voda se može raspršivati po površini sloja, dok se kod bioreaktora s vibrirajućim bubnjem može kapati iz središnjeg cilindra kroz sloj supstrata. U laboratorijskom mjerilu se pokazalo da su kontrola temperature i vlažnosti dobre u slučaju bioreaktora s miješanim slojem i bioreaktora s vibrirajućim bubnjem, dok podaci za velika mjerila nisu dostupni. Zahvaljujući velikim korištenim brzinama protoka plina, konvektivno hlađenje je vrlo učinkovito u plinovito-čvrstom fluidiziranom sloju, tako da kontrola temperature ne predstavlja problem niti u velikom mjerilu (Mitchell i sur., 2002).

Miješanje se kod ove skupine reaktora ostvaruje na različite načine. U nekim slučajevima, mješalo je učvršćeno i ima ili spiralni ili planetarni dizajn, koji omogućava kontinuirano miješanje (Slika 20). Drugi dizajn uključuje vertikalne vijke namještene na pokretnim kolicima koja se kreću natrag i naprijed duž osi reaktora. U tom slučaju, iako samo mješalo radi kontinuirano, svaki pojedini dio sloja miješan je samo povremeno, frekvencijom od jednom ili dvaput na sat, ovisno o brzini kolica i duljini bioreaktora. Dizajn mješala je ključan: supstrat se ne smije zdrobiti niti smije doći do smicanja uz stijenku bioreaktora (Mitchell i sur., 2002).

Bioreaktor s vibrirajućim bubnjem je testiran samo u laboratorijskom mjerilu, s korisnim volumenom reda veličine 1 L. U velikom mjerilu, miješanje uzrokovano rotacijom perforiranih bubnjeva vjerojatno neće biti učinkovito i moglo bi raditi malo bolje nego kod fiksnog sloja, uz značajni temperaturni gradijent duž pravca strujanja zraka.

S druge strane, plinovito-čvrsti fluidizirani slojevi se koriste u velikim mjerilima. Još davne 1975. godine Kikkoman je konstruirao plinovito-čvrsti fluidizirani sloj od 8000 L radnog volumena, tvrdeći da je proizvodnja enzima u ovom bioreaktoru ekonomičnija nego bilo SLF ili SSF-procesi u drugim bioreaktorima. Međutim, malo je informacija dostupno o radu njihovog bioreaktora, sa samo usputnim referencama u literaturi. Nedavno je provedeno istraživanje proizvodnje etanola u plinovito-čvrstim fluidiziranim slojevima, koji nude potencijalnu prednost stripiranja etanola u plinsku fazu tijekom fermentacije, minimizirajući tako problem inhibicije procesa etanolom (Mitchell i sur., 2002).



**Slika 20.** Bioreaktori s mehaničkim miješanjem, prikladni za kontinuirano i povremeno miješanje, koji pružaju dobru aeraciju statičnog sloja supstrata (Mitchell i sur., 2006).

- a) Bioreaktor s planetarnim miješalom (oštrica miješala se okreće oko svoje središnje osi, dok se istovremeno njena središnja os okreće oko središnje osi reaktora)
- b) Mješalica sa spiralnom oštricom koja struže po unutrašnjoj stijenci bioreaktora, podižući materijal koji se miješa.



## 2.8. Modeliranje SSF-bioreaktora

Matematički modeli mogu biti važni alati u dizajniranju SSF-bioreaktora i optimizaciji njihovog rada. U ovom poglavlju prikazan je kratak pregled matematičkih modela koji se primjenjuju na SSF-bioreaktore i objavljen je u Mitchell i sur. (2002).

Matematički modeli SSF-bioreaktora sastoje se od dva dijela (Mitchell i sur., 2002):

- kinetički submodel koji opisuje kinetiku rasta mikroorganizma i utjecaj uvjeta rasta na kinetiku rasta mikroorganizma
- submodel bilance mase i energije koji opisuje prijenos topline i mase u sloju supstrata te njihove izmjene između sloja i njegove okoline.

Takvi modeli mogu dati uvid u međudjelovanja raznih kinetičkih i transportnih fenomena koja utječu na performanse bioreaktora. Također daju informacije kako se promjenom radnih varijabli mogu poboljšati performanse bioreaktora.

### 2.8.1. Modeliranje kinetike rasta

Naše razumijevanje rasta u SSF-sustavu je vrlo površno u odnosu na naše razumijevanje rasta u submerznoj tekućoj kulturi (eng. submerged liquid culture, SLF). Za SLF su razvijeni vrlo sofisticirani modeli, uključujući strukturirane modele koji opisuju neke od unutarstaničnih procesa i segregirane modele koji uzimaju u obzir nehomogenost populacije. Slabo poznavanje rasta u SSF-sustavima može se pripisati kompleksnosti sustava. Mikroorganizam raste u matrici krutih čestica i pora koja je strukturno heterogena, dok se za SLF-sustav može pretpostaviti da su nutrijenti i stanice ravnomjerno raspoređeni u prostoru. Razdvajanje biomase od čvrste čestice je teško ili čak nemoguće. Zato su za praćenje rasta potrebne neizravne metode, a karakterizacija fiziološkog stanja biomase je teška, ako ne i nemoguća. Mnogi SSF procesi uključuju funge, koji rastu u obliku micelija elongacijom i grananjem hifa, što može dovesti do složenije kinetike rasta od one s kojom se susrećemo kod jednostaničnih organizama kakvi se obično koriste u SLF procesu. Statičan rad bioreaktora dovodi do pojave gradijenata temperature i koncentracije plinova u sloju supstrata. Također dolazi do pojave gradijenata kisika i hranjivih tvari unutar čestica podloge (Mitchell i sur., 2002).

Obzirom na ovakvu kompleksnost, većina matematičkih modela SSF-bioreaktora pokušava opisati prijenos topline i prijenos tvari u makromjerilu, tj. kroz sloj supstrata kao

cjelinu, te između sloja supstrata i stijenke bioreaktora i gornjeg slobodnog prostora (vršnog prostora), ali ne pokušava opisati difuziju kisika i nutrijenata unutar čestica. Stoga su jednačbe rasta obično jednostavne empirijske jednačbe u kojima je opisana ovisnost rasta o udjelu biomase, ali ne i o koncentracijama hranjivih tvari i kisika unutar čestica. Parametri tih jednačbi se određuju prilagođavanjem jednačbi eksperimentalnim profilima rasta. Važno je napomenuti da su u prikazu profila rasta korišteni različiti sustavi jedinica. Dva uobičajena načina izražavanja su grami biomase po gramu početnog suhog supstrata i grami biomase po gramu suhog supstrata u uzorku. Ovi načini izražavanja nisu ekvivalentni, zbog gubitka ugljika u obliku ugljikovog dioksida iz materijala koji fermentira tijekom procesa. Nadalje, kako je već navedeno, biomasa se rijetko može izravno odrediti, pa se tako grami biomase u gore navedenim jedinicama mogu zamijeniti miligramima glukozamina ili proteina ili neke druge komponente (Mitchell i sur., 2002).

Obično se primjenjuju linearni, eksponencijalni i logistički model rasta (Mitchell i sur., 2002).

Model linearnog rasta opisuje konstantnu brzinu rasta:

$$\frac{dX}{dt} = c \quad (2)$$

gdje je:

- X – koncentracija biomase (izražena u jednom od gore spomenutih sustava jedinica),
- c – linearna brzina rasta, s odgovarajućom mjernom jedinicom.

Eksponencijalni model rasta je opisan jednačbom:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (3)$$

gdje je:

- X – koncentracija biomase,
- $\mu$  – specifična brzina rasta.

Budući da ni model linearnog rasta, niti eksponencijalni model rasta ne opisuje početnu lag-fazu niti konačnu stacionarnu fazu (Mitchell i sur., 2002), koriste se druge jednačbe, pa se u najjednostavnijem slučaju te faze mogu opisati ovom jednačbom:

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (4)$$

Međutim, navedena jednačba ne opisuje dobro faze ubrzavanja i usporavanja rasta.

Logistički model opisuje usporavanje rasta do kojeg dolazi kad se koncentracija biomase približava nekoj maksimalnoj vrijednosti ( $X_m$ ):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) \quad (5)$$

Logistička krivulja se izravna kako se  $X$  asimptotski približava  $X_m$ . Često je početno povećanje koncentracije biomase sporo, tako da ova jednačba često daje odgovarajući opis cijelog ciklusa rasta, uključujući lag-fazu i stacionarnu fazu. Zato se ta jednačba obično ugrađuje u modele bioreaktora (Mitchell i sur., 2002).

Logistički model je simetričan oko točke infleksije, dok se u nekim slučajevima profil rasta sastoji od kratkog perioda naglog ubrzanja, nakon kojeg slijedi dugi period polakog usporavanja rasta. Za opisivanje takvih profila je predložena ova jednačba (eng. „power-law-equation“) koja je izvedena iz logističke jednačbe:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \left(\frac{X}{X_m}\right)^n\right) \quad (6)$$

Druga jednačba za nesimetrične profile je model koji dijeli ciklus rasta u fazu eksponencijalnog rasta (7) i fazu usporenog rasta (8):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad t < t_a \quad (7)$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu L e^{-k(t-t_a)} X \quad t \geq t_a \quad (8)$$

gdje je:

$t_a$  – vrijeme u kojem organizam izlazi iz eksponencijalne faze rasta i brzina rasta se počinje smanjivati,

$L$  – trenutno smanjenje specifične brzine rasta kako mikroorganizam ulazi u fazu usporenog rasta,

$k$  – konstanta brzine usporavanja rasta.

Ključni procesni parametri, kao što su aktivitet vode i temperatura podloge, mogu znatno varirati tijekom fermentacije. Budući da ove varijacije mogu imati vrlo štetne učinke na rast i nastajanje proizvoda, poželjno je uključiti učinke tih procesnih parametara u submodele kinetike rasta. Do danas se to radilo empirijski. Npr. da bi se odredio učinak temperature na rast, obično se istraži rast u određenom rasponu temperatura, ali tako da se održava konstantna temperatura tijekom fermentacije za svaku pojedinu krivulju rasta. Analizom

svake krivulje rasta dobiju se kinetički parametri za tu temperaturu, a zatim se pomoću empirijske jednadžbe opisuje njihov odnos. Mitchell i sur. (2002) citiraju jedan primjer ovakvog pristupa, gdje se određivao utjecaj temperature na parametre logističke jednadžbe:

$$\mu = \frac{A_1 e^{\left(\frac{-A_2}{RT}\right)}}{1 + A_3 e^{\left(\frac{-A_4}{RT}\right)}} \quad (9)$$

$$X_m = B_0 + B_1 T + B_2 T^2 + B_3 T^3 + B_4 T^4 \quad (10)$$

gdje je:

R – opća plinska konstanta,

A, B – empirijske konstante.

U ovom pristupu modeliranju utjecaja temperature na rast u SSF-bioreaktoru gdje postoje vremenske razlike u temperaturi, postoji implicitna pretpostavka da rast mikroorganizma ovisi samo o trenutnoj temperaturi, a ne i o prošlim doživljenim temperaturama. Međutim, to je malo vjerojatno. Razmotrimo mikroorganizam koji optimalno raste na 37 °C, i na kojeg štetno utječe temperatura od 50 °C, do koje lako može doći tijekom fermentacije. Temperatura koja je između te dvije vrijednosti, na primjer 45 °C, bit će tijekom fermentacije postignuta u dva slučaja: prvi put u ranoj fazi fermentacije, dok se temperatura povećava od optimuma do maksimuma, i jednom u kasnijoj fazi fermentacije, kada se rast usporava. Iako je temperatura jednaka u oba trenutka, fiziološko stanje će biti prilično različito. U prvom slučaju mikroorganizam je prošao iskustvo razmjerno povoljnih temperatura, dok je u drugom slučaju mikroorganizam pretrpio štetne visoke temperature tijekom nekoliko sati. U eksperimentu osmišljenom da oponaša tu situaciju, u kojem su kulture prenesene s 37 °C do 50 °C tijekom 10 sati, a zatim vraćene na 37 °C, *Rhizopus oligosporus* je nakon povratka na 37 °C bilo potrebno 20 sati da postigne onu brzinu rasta koju je imala kultura inkubirana na 37 °C cijelo vrijeme. Međutim, takvi pristupi modeliranju gdje bi se taj efekt uzeo u obzir nisu razvijeni, niti postoje eksperimentalni rezultati koji bi bili potrebni za razvoj takvih modela (Mitchell i sur., 2002).

### 2.8.2. Modeliranje prijenosa mase i topline u sloju supstrata

Submodel bilance mase i energije modela bioreaktora opisuje prijenos topline i mase kroz čvrsti sloj koji je promatran kao cjelina, te izmjene između čvrstog sloja i drugih faza, kao što su vršni prostor i stijenka bioreaktora (Mitchell i sur., 2002). U slučaju dobro miješanog sloja

može se pretpostaviti njegova homogenost te će model sadržavati samo obične diferencijalne jednačbe. U slučaju statičkih slojeva supstrata, neizbježni su gradijenti te su potrebne parcijalne diferencijalne jednačbe kako bi se uzele u obzir varijacije u vremenu i prostoru unutar sloja. Na primjer, za opisivanje jednodimenzionalnog prijenosa topline kod reaktora s fiksnim slojem se može koristiti slijedeća jednačba, uz pretpostavku da je sloj dovoljno širok da prijenos topline okomito na smjer strujanja zraka bude zanemariv:

$$\rho_b C_{pb} \left( \frac{\partial T}{\partial t} \right) + \rho_a (C_{pa} + f\lambda) V_z \left( \frac{\partial T}{\partial z} \right) = k_b \left( \frac{\partial^2 T}{\partial z^2} \right) + \rho_s (1 - \varepsilon) Y \frac{dX}{dt} \quad (11)$$

gdje je:

$\rho_b$  – gustoća čvrstog sloja [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$\rho_a$  – gustoća zraka [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$C_{pb}$  – toplinski kapacitet čvrstog sloja [ $\text{J kg}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ]

$C_{pa}$  – toplinski kapacitet zraka [ $\text{J kg}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ]

$T$  – temperatura čvrstog sloja [ $^\circ\text{C}$ ]

$f$  – brzina kojom se zasićenje zraka vodom povećava s temperaturom [ $\text{kg vode kg}^{-1} \text{ zraka } ^\circ\text{C}^{-1}$ ]

$\lambda$  – entalpija isparavanja vode [ $\text{J kg}^{-1}$ ]

$V_z$  – površinska brzina zraka [ $\text{m s}^{-1}$ ]

$z$  – aksijalna koordinata, tj. paralelna sa smjerom strujanja zraka [ $\text{m}$ ]

$k_b$  – toplinska provodljivost čvrstog sloja [ $\text{W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ]

$\rho_s$  – gustoća čestica supstrata [ $\text{kg m}^{-3}$ ]

$\varepsilon$  – udio šupljeg prostora u čvrstom sloju [bezdimenzionalan]

$X$  – koncentracija biomase [ $\text{kg biomase kg}^{-1} \text{ supstrata}$ ]

$Y$  – prinos topline nastale zbog rasta biomase [ $\text{J kg (biomase)}^{-1}$ ]

Prvi izraz na lijevoj strani jednačbe opisuje akumulaciju energije unutar čvrstog sloja, dok drugi opisuje odvođenje topline konvekcijom i isparavanjem. Član  $f\lambda$  unutar tog izraza proizlazi iz pretpostavke da zrak ostaje zasićen tijekom strujanja kroz sloj. Isparavanje vode radi održavanja zasićenosti zraka daje mu veći prividni toplinski kapacitet. U idealnom slučaju, udio vode u zasićenom zraku trebao bi biti opisan Antoine-ovom jednačbom, međutim u ovoj jednačbi je korištena linearna aproksimacija koja ima smisla samo pri temperaturama iznad otprilike  $20 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Promjene tijekom vremena su obično male u odnosu na varijacije zbog udaljenosti i zato modeli pseudoustaljenog stanja mogu dati dobre aproksimacije. Većina modela koji su napravljeni do sada su usredotočeni na energetske bilance, iako su neki modeli ugradili prijenos kisika, dok su drugi ugradili bilance vode (Mitchell i sur., 2002).

## 2.9. Izdvajanje proizvoda SSF-procesa

Kod nekih SSF-procesa, kao što je proizvodnja fermentiranih namirnica i stočne hrane, cijeli fermentirani čvrsti materijal koristi se kao proizvod. U tom slučaju, proizvod se može koristiti svjež ili se može osušiti prije upotrebe (Mitchell i sur., 2002).

Međutim, postoje i mnogi slučajevi u kojima je poželjno izdvojiti i pročistiti određeni proizvod. Glavna razlika između izdvajanja proizvoda fermentacije iz SSF i submerznog sustava je ta što kod SSF-sustava postoji dodatni korak ekstrakcije produkta iz krutog matriksa. Obično to uključuje dobivanje tekućeg ekstrakta, a daljnje izdvajanje i pročišćavanje je obično slično dobro poznatim *downstream* postupcima kakvi se koriste i kod submerznih fermentacijskih procesa. Ovdje ćemo se usredotočiti na početni korak ekstrakcije ili izdvajanja, koji je jedinstven za SSF-procese (Mitchell i sur., 2002).

### 2.9.1. Ekstrakcija enzima

Postoji veliki interes za korištenje SSF-procesa u proizvodnji enzima. Obično se enzimi izdvajaju iz fermentiranog krutog materijala postupkom ekstrakcije fermentirane krutine. U nekim slučajevima krutina se suši prije postupka ekstrakcije. Ekstrakciju enzima pokreće razlika u koncentraciji enzima između tekuće faze unutar čestica i otopine za ekstrakciju koja okružuje čestice. Učinkovitost postupka ispiranja se može procijeniti na temelju dva kriterija: udjela enzima izdvojenog iz čvrste podloge i koncentracije enzima u ekstraktu. Jasno, cilj je postizanje visokih prinosa, uz dobivanje visokih koncentracija u ekstraktu. Uspjeh ovisi o uvjetima ekstrakcije, o omjeru otopine za ekstrakciju i krutine koji se koristi te svojstvima otopine za ekstrakciju (Mitchell i sur., 2002).

Topljivost enzima u otopini za ispiranje utječe na učinkovitost ekstrakcije. Kako bi se povećala topljivost, pH-vrijednost otopine za ispiranje treba biti udaljena od izoelektrične točke enzima. Otopine soli za ekstrakciju enzima mogu biti učinkovitije od vode zbog veće ionske jakosti, iako je važno ne koristiti soli koje smanjuju topljivost enzima, kao što je amonijev sulfat. Tako su se npr. otopine natrijeva klorida pokazale učinkovitijima od vode u ispiranju proteaze iz rižinih mekinja i učinkovitijima od otopina neionskih deterdženata u ispiranju proteaze iz pšeničnih mekinja. Međutim, treba voditi računa o tome da u nekim slučajevima otopine soli mogu pogodovati ekstrahiranju nepoželjnih spojeva iz fermentirane mase. Na primjer, pri ekstrakciji enzima iz drveta, otopine soli mogu pogodovati istodobnoj

ekstrakciji polifenola, koji ometaju daljnje korake pročišćavanja. Dvofazne otopine za ispiranje mogu se koristiti u postupku kombinirane ekstrakcije i pročišćavanja, kao što je pokazano u izolaciji glukoamilaze iz pšeničnih mekinja. Ekstrakcijskom smjesom koja se sastojala od PEG 6000 i kalijevog fosfata postignuto je izdvajanje 95% glukoamilaze u fazi kalijevog fosfata, dok su se čvrsti ostaci skupljali na granici faza.

Omjer otopine za ispiranje i čvrste sirovine koji je potreban za dobivanje visoke učinkovitosti ekstrakcije ovisi o prirodi korištenog postupka. U literaturi su opisani različiti načini ekstrakcije (Mitchell i sur., 2002) - izravna ekstrakcija, perkolacija, ekstrakcija pulsirajućeg toka i protustrujna ekstrakcija:

- Prilikom izravne ekstrakcije se ekstrakcijska otopina doda krutoj sirovini u posudi koja se zatim miješa.
- Kod perkolacije, krutine su postavljene u kolonu, a ekstrakcijska otopina dodaje se na vrhu. Ventil na otvoru na dnu je otvoren i tekućina se polako cijedi kroz čvrsti sloj.
- Pri ekstrakciji pulsirajućeg toka krutina je smještena u kolonu, a na vrhu se kontroliranom brzinom pomoću pumpe dodaje otopina za ekstrakciju.

Međutim, ovi postupci zahtijevaju visoke omjere tekućeg prema krutom, koji ponekad dostižu do 10 L vode po kilogramu čvrstog uzorka. Mogući su visoki stupnjevi izdvajanja, ali dobivene otopine su relativno razrijeđene. Opisane strategije se ne mogu koristiti u procesima izdvajanja, budući da su u suprotnosti s jednom od ranije navedenih prednosti SSF-procesa, a to je činjenica da se u SSF-procesima može postići visoka koncentracija proizvoda. Jednako je skupo pročistiti enzim iz vrlo razrijeđenog ekstrakta kao i iz razrijeđene fermentirane podloge dobivene submerznom fermentacijom (Mitchell i sur., 2002).

Istraživana je četverostupanjska protustrujna ekstrakcija, koja se provodi u četiri posude koje sadrže krutine u različitim fazama ispiranja (Mitchell i sur., 2002). Svježa otopina za ispiranje dodaje se krutini koja je već tri puta bila ekstrahirana. Nakon te četvrte ekstrakcije, ova krutina se baca i zamijeni novom šaržom krutog materijala koji je ekstrahirana već tri puta, a ekstrakt se dodaje u posudu s krutinom koja je prethodno bila dva puta ekstrahirana. Postupak ekstrakcije se ponavlja, a tekućina koja je prošla kroz tri šarže krutog materijala se konačno koristi za ekstrakciju svježeg materijala. Ekstrakt iz ovog koraka predstavlja konačni dobiveni ekstrakt. Protustrujno gibanje tekućine i krutine znači da je izlazna tekućina u ravnoteži sa svježim krutim materijalom, koji sadrži najvišu koncentraciju enzima, umjesto da bude u ravnoteži s iscrpljenom krutinom, kao što je to slučaj kod drugih metoda. Ova metoda ekstrakcije omogućuje visok postotak izdvajanja proizvoda, uz korištenje niskih omjera



otopine za ekstrakciju i čvrstog materijala. U procesu sa 4 do 5 faza može se postići učinkovitost ispiranja od 85%, koristeći niske omjere ekstrakcijske otopine i krutine (npr. 1 L otopine za ekstrakciju po kilogramu suhe krute tvari) (Mitchell i sur., 2002).

Potencijalni problem kod svih tih metoda ekstrakcije je zadržavanje ekstrakcijske otopine unutar čestica podloge, jer se SSF-procesi obično provode na supstratima čija je vlažnost manja od njihovog maksimalnog kapaciteta zadržavanja vode. Tijekom procesa ekstrakcije, ovi supstrati imaju tendenciju zadržavanja dovoljno otopine za ispiranje da dosegnu svoj maksimalni kapacitet zadržavanja vode. Otopina za ispiranje zadržana u supstratu sadrži enzim, što predstavlja gubitak tijekom procesa izdvajanja. Prešanje krutog supstrata između različitih faza ekstrakcije može poboljšati izdvajanje. Zapravo, prešanje fermentiranog krutog supstrata se koristi za izdvajanje enzima. Postupak se provodi u dva koraka. Prvo se koristi hidraulična preša za voće (pritisak 220 bara / 1 minuta). U drugom koraku supstratu se doda količina vode jednaka volumenu ekstrakta izdvojenog pri prvom prešanju, pa se prešanje ponovi. Ovaj postupak daje omjer od 1,2 L konačnog ekstrakta po kilogramu početne krutine, a izdvađa se 85-95% enzima (Mitchell i sur., 2002).

Nažalost, niski omjeri tekućeg prema krutom, koji su poželjni sa gledišta dobivanja najveće moguće koncentracije enzima, mogu dovesti do visokih koncentracija ekstrahiranih polisaharida, koji čine ekstrakt dosta ljepljivim i ometaju daljnje korake pročišćavanja. Polisaharidi se mogu istaložiti dodatkom kalcijevog klorida, ali se mora paziti da se ne istaloži i enzim (Mitchell i sur., 2002).

### **2.9.2. Ispiranje drugih proizvoda**

Ekstrakcija je također korisna tehnika za izdvajanje raznih nehlapljivih proizvoda (pigmenti, antibiotici, biljni hormoni rasta i organske kiseline) koji se mogu proizvesti SSF-procesima. Odabir otopine za ekstrakciju ovisit će o svojstvima molekule koja se izolira. Voda i vodeni puferi mogu biti vrlo učinkoviti u ekstrakciji spojeva koji su dobro topljivi u vodi, dok se za manje polarne spojeve mogu koristiti organska otapala, poput etanola. Razmatranja učinkovitosti procesa su ista kao i kod ekstrakcije enzima, a poželjan je visok stupanj izdvajanja i koncentrirani ekstrakti.

Proizvod kojem je posvećena najveća pažnja je giberelinska kiselina (biljni hormon rasta), koja se izdvađa četverostupanjskom protustrujnom ekstrakcijom, koristeći razrijeđeni

etanol. Također je istraživana ekstrakcija superkritičnim fluidima, iako giberelinska kiselina ostaje unutar krute mase (Mitchell i sur., 2002).

### **2.9.3. Izdvajanje hlapljivih proizvoda**

Hlapljivi produkti se mogu izdvojiti iz krute podloge bez potrebe za ekstrakcijom. U slučaju etanola ekstrakcija vodom je nepoželjna i koncentracija mora biti visoka da bi se provela destilacija, a izravno prešanje daje loše prinose. Izravna destilacija fermentiranog supstrata je moguća, iako je ekonomski izvediva samo ukoliko se iskorišteni supstrat može upotrijebiti kao stočna hrana. Kod procesa s fluidiziranim slojem, etanol se može izolirati direktnim stripiranjem, gdje se etanol kondenzira iz struje plina. Hlapljivi spojevi arome su još više problematični, jer obično se proizvode u samo malim koncentracijama (Mitchell i sur., 2002).

### **2.9.4. Izdvajanje fungalnih spora**

Razni SSF-procesi uključuju proizvodnju fungalnih spora, npr. za uporabu kao biopesticidi ili kao inokulum za proizvodnju plavog sira. U nekim slučajevima, produkt fermentacije se jednostavno suši i melje, ali treba posvetiti posebnu pažnju da se ne inaktiviraju spore. Obično je cilj sušiti brzo, sa suhim zrakom temperature oko 30-35 ° C, iako su neke spore donekle otporne na više temperature. Ponekad se to sušenje može obaviti u bioreaktoru nakon završetka fermentacije, tako da se prekine dotok vlažnog zraka i započne dotok suhog zraka. U drugim je slučajevima poželjno izolirati spore odvojeno. To se može postići izravnim usisavanjem spora iz mase (Mitchell i sur., 2002).

### **3. ZAKLJUČCI**

Na temelju činjenica navedenih u ovom završom radu doneseni su slijedeći zaključci:

1. Razvoj suvremene biotehnologije do sada je bio usmjeren uglavnom na submerzne procese, koji su se pokazali pogodnijima za većinu proizvoda. Međutim, u određenim okolnostima i za određene proizvode, uzgoj na čvrstim supstratima je prikladna, a ponekad i bolja opcija od submerznog uzgoja.
2. U procesima uzgoja na čvrstim supstratima važan je utjecaj fizikalnih čimbenika (vlage, temperature, pH-vrijednosti, sastava plinovite faze, koncentracije supstrata i produkata) koji utječu na rast mikroorganizama. Zato je iznimno važno poboljšati mogućnosti mjerenja i kontrole procesnih parametara te optimirati konstrukciju bioreaktora.
3. Prema glavnim izvorima ugljika koje sadrže, sirovine za ove procese mogu se svrstati u 3 skupine - škrobne, lignocelulozne i sirovine koje sadrže uglavnom topljive šećere.
4. Uzgoj na čvrstim supstratima predstavlja djelotvoran način korištenja otpadnog lignoceluloznog materijala i dobivanja proizvoda s visokom dodanom vrijednošću. Ovakvi postupci su ekološki i ekonomski opravdani jer se primjenjuju jeftine i lako dostupne obnovljive sirovine poput poljoprivrednog i drvnog otpada.
5. Obzirom na dostupnost lignoceluloznih sirovina, u sklopu razvoja biotehnologije u Republici Hrvatskoj treba razmotriti uzgoj na čvrstim supstratima kao jednu od mogućnosti za proizvodnju mikrobne biomase i pojedinih metabolita.

## **4. LITERATURA**

Adapa, P., Karunakaran, C., Tabil, L., Schoenau, G. (2009) Potential applications of infrared and raman spectromicroscopy for agricultural biomass. *Agric. Eng. Int.: the CIGR E-J.* Manuscript 1081. Vol. XI.

<<http://www.cigrjournal.org/index.php/Ejournal/article/viewFile/1081/1151>>.     Pristupljeno 24. lipnja 2015.

Ali, H. Kh. Q., Zulkali, M. M. D. (2011) Utilization of agro-residual ligno-cellulosic substances by using solid state fermentation. *Croat. J. Food Technol. Biotechnol. Nutr.* **6** (1-2), 5-12.

Anonymus 1 (2015) Fermented bean curd,

<[http://en.wikipedia.org/wiki/Fermented\\_bean\\_curd](http://en.wikipedia.org/wiki/Fermented_bean_curd)>.   Pristupljeno 14. lipnja 2015.

Anonymus 2 (2015) Natto,

<<https://en.wikipedia.org/wiki/Natto>>.   Pristupljeno 14. lipnja 2015.

Anonymus 3 (2015) List\_of\_fermented\_soy\_products,

<[https://en.wikipedia.org/wiki/List\\_of\\_fermented\\_soy\\_products](https://en.wikipedia.org/wiki/List_of_fermented_soy_products)>.   Pristupljeno 14. lipnja 2015.

Anonymus 4 (2015) Tapioca (Manihot esculenta Crantz.),

<<http://entekrishi.com/blog/seeds/tapioca-manihot-esculenta-crantz>>.   Pristupljeno 24. lipnja 2015.

Anonymus 5 (2015) Cassava,

<<https://en.wikipedia.org/?title=Cassava>>.   Pristupljeno 24. lipnja 2015.

Anonymus 6 (2014) Lignin staining,

<<http://amrita.vlab.co.in/?sub=3&brch=188&sim=778&cnt=1>>.   Pristupljeno 30. kolovoza 2014.

Anonymus 7 (2015) Sorgul | Ierburi Uitate,

<<https://ierburiuitate.wordpress.com/2014/02/20/sorgul/comment-page-1>>.   Pristupljeno 24. lipnja 2015.

- Anonymus 8 (2015) *L. plantarum* probiotic shown to help lower cholesterol, <<http://www.optibacprobiotics.co.uk/blog/2013/11/1-plantarum-probiotic-shown-to-help-lower-cholesterol>>. Pristupljeno 27. lipnja 2015.
- Anonymus 9 (2015) *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii* ATCC9614, <<http://www.genoscope.cns.fr/spip/-Propionibacterium-freudenreichii-.html>>. Pristupljeno 27. lipnja 2015.
- Anonymus 10 (2015) *Trichoderma reesei* <[https://en.wikipedia.org/wiki/Trichoderma\\_reesei](https://en.wikipedia.org/wiki/Trichoderma_reesei)>. Pristupljeno 27. lipnja 2015.
- Brinchi, L., Cotana, F., Fortunati, E., Kenny, J. M. (2013) Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. *Carbohydr. Polym.* **94**, 154-169.
- Buljubašić, M. (2012) Mogućnosti korištenja lignoceluloznih sirovina poljoprivrednog porijekla u Republici Hrvatskoj. Završni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Chen, J., Zhu, Y. (2013) Solid state fermentation for foods and beverages, CRC Press, Boca Raton, str. 2-8.
- Kubicek, C. P. (2013) Fungi and lignocellulosic biomass, Wiley, New York, str. 3.
- Lacković, I. (2012) Korištenje lignoceluloznih sirovina za uzgoj makrofunga na čvrstim supstratima. Završni rad. Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.
- Lange, J. P. (2007) Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* **1**, 39-48.

Matcham, S. E., Jordan, B. R., Wood, D. A. (1985) Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **21**, 108-112.

Mitchell, D. A., Berovič, M. (2003) Solid state fermentations. U: Bioprocess engineering: doctoral/post-doctoral level course, (Berovič, M., Kieran, P., ured.), Faculty of Chemistry and Chemical technology, Ljubljana, str. 202-230.

Mitchell, D. A., Berovič, M., Krieger, N. (2002) Overview of solid state bioprocessing. *Biotechnol. Annu. Rev.* **8**, 183-225.

Mitchell, D. A., Krieger, N., Berovič, M. (2006) Solid-state fermentation bioreactors, Fundamentals of design and operation, Springer, Berlin Heidelberg.

Mussatto, S. I., Ballesteros, L. F., Martins, S., Teixeira, J. A. (2009) Use of agro-industrial wastes in solid-state fermentation processes. U: Biotechnology for agro-industrial residues, (Singh nee' Nigam, P., Pandey, A., ured.), Springer Netherlands, str. 121-140.

Olbrantz, C. (2011) Rhizopus stolonifer- Black Bread Mold Home Page  
<[http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/olbrantz\\_chri/index.htm](http://bioweb.uwlax.edu/bio203/2011/olbrantz_chri/index.htm)> Pristupljeno 27. lipnja 2015.

Palonen, H. (2004) Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose, Dissertation for the degree of doctor of technology, VTT Technical Research Centre Of Finland.

Pandey, A., Soccol, C. R., Mitchell, D. (2000) New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochem.* **35**, 1153–1169.

Ride, J. P., Drysdale, R. B. (1972) A rapid method for the chemical estimation of filamentous fungi in plant tissue. *Physiol. Plant Pathol.* **2**(1), 7-15.

Sederoff, R. R., McKay, J. J., Ralph, J., Hatfield R. D. (1999) Unexpected variation in lignin, *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**, 145-152.



Singh, S. K., Sczakas, G., Soccol, C. R., Pandey, A. (2008) Production of enzymes by solid-state fermentation. U: Current developments in solid-state fermentation, (Pandey, A., Soccol, C. R., Larroche, C., ured.), Springer Science & Business Media, New York, str. 183-204.

Sluiter, J. B., Ruiz, R. O., Scarlata, C. J., Sluiter, A. D., Templeton, D. W. (2010) Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks, 1. Review and description of methods, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 9043–9053.

Thomas, L., Larroche, C., Pandey, A. (2013) Current developments in solid-state fermentation. *Biochem. Eng. J.* **81**, 146– 161.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. (2010) Lignin biosynthesis and structure, *Plant. Physiol.* **153**, 895-905.

Wyman, C. E., Decker, S. R., Himmel, M. E., Brady, J. W., Skopec, C. E., Viikari, L. (2005) Hydrolysis of cellulose and hemicellulose. U: Polysaccharides-Structural diversity and functional versatility, 2. izd., (Dimitriu, S., ured.), New York, str. 995-1035.